



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*)

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Winnie Michelle CONTRERAS MARMOLEJO

ASESOR

Alexei Vicent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2018



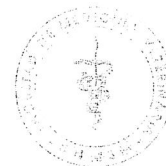
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Contreras W. Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2018.



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Aula de Postgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 20 de diciembre de 2018**, a las **09:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0282-EPMV/FMV-2018, integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg. Wilfredo Huanca López	Presidente del Jurado
MV. Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta	Asesor de la Tesis
MV Mg. Luis Manuel Barrios Arpi	Miembro del Jurado
MV Milder Ayón Sarmiento	Miembro del Jurado

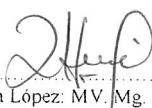
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Doña: **CONTRERAS MARMOLEJO, WINNIE MICHELLE** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

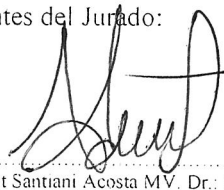
“EVALUACIÓN DE DIMETILACETAMIDA Y DIMETILFORMAMIDA COMO AGENTES CRIOPROTECTORES PARA ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE ALPACA (*Vicugna pacos*)”,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de diecisiete (17).

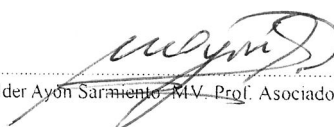
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **10:15 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Wilfredo Huanca López: MV. Mg. Prof. Principal D.E.


Alexei Vicent Santiani Acosta MV. Dr.: Prof. Asociado T.P.


Luis Manuel Barrios Arpi: MV. Mg. Prof. Auxiliar T.C.


Milder Ayón Sarmiento: MV. Prof. Asociado D.E.⁹



DEDICATORIA

A Dios,

Por brindarme salud, entendimiento y cuidar de mi familia siempre. Por su misericordia y perdón ante los errores que cometo. Por hacer que lo imposible se haga realidad y por acompañarme todos los días de mi vida.

A mis padres, Soledad y Rolando

Por su infinito amor, su apoyo incondicional y sobre todo la confianza que tuvieron desde que inicié la carrera. Porque jamás me han negado la posibilidad de continuar estudiando y apuestan siempre por mi futuro. Los amo.

A mi hermana, Chaddy

Por su paciencia y su apoyo durante toda mi vida, por enseñarme a mostrar siempre una sonrisa y a vivir dejando las preocupaciones fuera de casa. Por compartir muchos momentos buenos y malos, y jamás dejar que me sienta sola.

A mi abuelita, Anita

Por haber compartido su vida conmigo y haberme dado lecciones para el resto de mi vida. Porque antes que yo, ella confiaba en mi potencial y me incentivó siempre a querer más. Siempre vivirás en mi corazón, babu.

Winnie

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Alexei Santiani Acosta,

Por su paciencia, su confianza y el tiempo brindado para la realización de este trabajo de investigación. Pero sobre todo por su exigencia, que me permitió culminar esta fase exitosamente.

A mis compañeros de laboratorio: Omar Quispe y Caroline Duymovich,

Por su apoyo en la realización del trabajo experimental y por los buenos momentos compartidos durante todo este tiempo.

A Felipe Ruiz,

Por su valiosa ayuda para elaborar el análisis estadístico de este trabajo de investigación.

A Raúl Pacsi,

Por escucharme y comprenderme en los momentos difíciles de mi vida, por apoyar mis ideas y compartirme las suyas, por demostrarme que lo difícil puede conseguirse con mucho esfuerzo y perseverancia. Gracias por todas las sonrisas compartidas.

Winnie

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1.	MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN CSA	5
2.2.	RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO	7
2.3.	CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE CSA	9
2.4.	TRASCENDENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO	11
2.5.	FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA.....	12
2.5.1.	Maduración epididimaria	12
2.5.2.	Capacitación espermática	13
2.5.3.	Reacción acrosomal.....	14
2.6.	EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	14
2.6.1.	Evaluación de la motilidad del espermatozoide	16
2.6.2.	Evaluación de viabilidad espermática e integridad del acrosoma	16
2.6.3.	Evaluación de la actividad de las mitocondrias.....	18
2.7.	CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN	21
2.7.1.	Factores críticos de criopreservación	21
2.7.2.	Agentes crioprotectores	23
2.7.3.	Alteraciones de los espermatozoides criopreservados	25
2.7.4.	Criopreservación de espermatozoides de CSA	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1.	Lugar de ejecución y periodo de duración	30
3.2.	Muestra de estudio	30
3.3.	Transporte de las muestras	31
3.4.	Dilutor y crioprotectores	32
3.5.	Recuperación de espermatozoides del epidídimo	32
3.6.	Diseño experimental	33
3.7.	Criopreservación de los espermatozoides del epidídimo	34
3.8.	Descongelamiento y evaluación de los espermatozoides	35
3.9.	Citometría de flujo	36
3.10.	Análisis de la información	40
IV.	RESULTADOS.....	41
V.	DISCUSIÓN	44

VI.	CONCLUSIONES	47
VII.	ANEXOS	48
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%) sobre la motilidad post descongelamiento en espermatozoides epididimarios de alpacas..... 42

CUADRO 2. Efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%) sobre la viabilidad espermática en espermatozoides epididimarios de alpacas 43

CUADRO 3. Efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%) sobre el potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides epididimarios de alpacas..... 43

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Sistema de fosforilación oxidativa	19
Fig. 2: Diseño factorial de dos por tres para evaluar el efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en concentraciones de 1%, 3.5% y 7% en espermatozoides epididimarios de alpaca.....	33
Fig. 3. Esquema de la curva de enfriamiento del programa 7 utilizado para semen de alpaca en este estudio.....	34
Fig. 4: Patrones de espermatozoides epididimarios de alpaca con SYBR-14/PI evaluados en los canales 2 y 5, respectivamente: las imágenes muestras espermatozoides viables con alto PMM evaluados por citometría de flujo	37
Fig. 5: Patrones de espermatozoides epididimarios de alpaca con MitoTracker Deep Red FM evaluados en el canal 11, respectivamente: las imágenes muestras espermatozoides muertos con bajo PMM evaluados por citometría de flujo.....	38
Fig. 6: Análisis de viabilidad espermática mediante diagrama de dispersión DOT-PLOT de espermatozoides epididimarios de alpaca con SYBR14 y PI, espermatozoides viables en el cuadrante superior izquierdo y espermatozoides muertos en el cuadrante inferior derecho	39
Fig. 7: Análisis de potencial de membrana mitocondrial (PMM) mediante histograma de espermatozoides epididimarios de alpaca con Mitotracker Deep Red FM, alto PMM hacia la derecha y bajo PMM hacia la izquierda.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CSA	: Camélidos sudamericanos
DMA	: Dimetilacetamida
DMF	: Dimetilformamida
EG	: Etilenglicol
DMSO	: Dimetilsulfóxido
SYBR	: Marca de sinergia
PI	: Yoduro de propidio
FITC	: Fluoresceína-isotiocianato
PSA	: Aglutinina <i>Pisum sativum</i>
PNA	: Aglutinina <i>Arachis hypogaea</i>
PHA	: Aglutinina <i>Phaseolus vulgaris</i>
M	: Molar
mL	: Mililitro
μL	: Microlitro
ROS	: Especies de oxígeno reactivo
AMPc	: Adenosín monofosfato cíclico
LDL	: Lipoproteínas de baja densidad
TRIS	: tris –hidroximetilaminometano
MINAGRI	: Ministerio de agricultura

RESUMEN

Los crioprotectores del grupo amida han demostrado ser eficaces en la criopreservación espermática de distintas especies; sin embargo, su empleo en camélidos sudamericanos es aún escaso. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de los tipos (dimetilacetamida y dimetilformamida) y concentraciones (1%, 3.5% y 7%) de agentes crioprotectores sobre tres parámetros espermáticos durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Se trabajaron con 40 epidídimos empleando el dilutor leche descremada-fructosa-yema de huevo y se empleó un diseño factorial 2x3 formado por dos crioprotectores y tres concentraciones (Dimetilacetamida 1%, dimetilacetamida 3.5%, dimetilacetamida 7%, dimetilformamida 1%, dimetilformamida 3.5% y dimetilformamida 7%). Se evaluaron los parámetros de viabilidad espermática (SYBR-14/PI) y potencial de membrana mitocondrial (MitoTracker Deep Red FM) mediante citometría de flujo y motilidad post descongelamiento por microscopía. Para el análisis estadístico se utilizó análisis de varianza para el diseño factorial y para determinar diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos se usó la prueba de Tukey. Los resultados mostraron efecto significativo del tipo de crioprotector ($p=0.001$) obteniendo mejores efectos con DMA que con DMF, respecto al porcentaje de motilidad post descongelamiento (14% vs. 10%). Asimismo, hubo efecto significativo de la concentración en todos los parámetros evaluados ($p<0.001$), obteniendo mayores porcentajes de motilidad post descongelamiento, viabilidad espermática y potencial de membrana mitocondrial con concentraciones de 1% y 3.5% que 7%. Sin embargo, no se halló efecto significativo de la interacción crioprotector-concentración en ninguno de los parámetros. En conclusión, dimetilacetamida tuvo un mejor efecto que dimetilformamida respecto a la motilidad post descongelamiento. Además, las concentraciones de 1% y 3.5% mostraron mejores resultados de los parámetros espermáticos antes mencionados que concentraciones de 7%, independientemente del tipo de crioprotector.

ABSTRACT

Cryoprotectants of the amide group have been shown to be effective in the cryopreservation of spermatozoa of different species; however, its use in South American camelids is still scarce. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of types (dimethylacetamide and dimethylformamide) and concentrations (1%, 3.5% and 7%) of cryoprotective agents on three sperm parameters during the process of cryopreservation of epididymal alpaca spermatozoa. Forty epididymis were processed with dilutor skim milk-fructose-egg yolk and we used factorial design 2x3 formed by two cryoprotectants and three concentrations (Dimethylacetamide 1%, dimethylacetamide 3.5%, dimethylacetamide 7%, dimethylformamide 1%, dimethylformamide 3.5% and dimethylformamide 7%). The parameters of sperm viability (SYBR-14 / PI) and mitochondrial membrane potential (MitoTracker Deep Red FM) were evaluated by flow cytometry and motility after thawing by microscopy. For the statistical analysis, analysis of variance was used for the factorial design and to determine statistical differences between means of the treatments the Tukey test was used. The results showed a significant effect of the type of cryoprotectant ($p = 0.001$) getting better effects with DMA than with DMF, with respect to the percentage of motility after thawing (14% vs. 10%). Likewise, there was a significant effect of the concentration on all parameters evaluated ($p < 0.001$), obtaining higher percentages of motility after thawing, sperm viability and mitochondrial membrane potential with concentrations of 1% and 3.5% than 7%. However, no significant effect of the cryoprotectant-concentration interaction was found in any of the parameters. In conclusion, dimethylacetamide had a better effect than dimethylformamide with respect to motility after thawing. In addition, concentrations of 1% and 3.5% better preserved the sperm characteristics mentioned above than concentrations of 7%, regardless of the type of cryoprotectant.

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería de los camélidos sudamericanos (CSA), alpaca y llama, constituye una de las actividades productivas y económicas de gran valor para la población altoandina de nuestro país. De ella dependen más de 150 mil familias pertenecientes, mayormente, a comunidades campesinas de departamentos considerados en situación de pobreza y extrema pobreza; para estas familias la crianza de camélidos representa del 70 al 80% del ingreso familiar anual (Ministerio de Agricultura, 2017) a través de la producción de fibra y el consumo o venta de carne, así como su piel y cuero, para fines industriales y artesanales (Fernández-Baca, 2005).

Por otro lado, el uso de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA) con semen congelado y la transferencia de embriones, han aportado mejoramiento genético de especies domésticas como los bovinos, al permitir la diseminación masiva de características deseables por parte tanto del macho como de la hembra (Fernández-Baca, 2005). Sin embargo, en CSA los resultados obtenidos no justifican aún la aplicación intensiva de dichas técnicas en nuestro país. Respecto a la IA con semen congelado, la mayor dificultad ha sido la colección de semen de buena calidad debido a la posición y el transcurso de la cópula; así como los atributos propios del semen en esta especie, altamente viscoso con porcentajes bajos de concentración y motilidad. Estas características condicionan dentro del laboratorio su evaluación, dilución y criopreservación para trabajos de investigación que buscan una futura aplicación en campo.

En los estudios realizados en criopreservación de espermatozoides de alpaca, los resultados de los parámetros luego del descongelamiento varían entre 5% a 36%, respecto a motilidad; entre 17% a 61%, respecto a la integridad de la membrana plasmática y 21% a 93% en cuanto a viabilidad e integridad acrosomal (Morton *et al.*, 2007, 2010; Canorio, 2008; Rodríguez, 2009; Banda *et al.*, 2010; Mancisidor, 2013; Terreros, 2011; Choez, 2016). Asimismo, entre los escasos reportes detallados de IA con semen congelado en alpacas se encuentra el reporte de Pérez *et al.* (2016) quienes obtuvieron 25% de gestaciones al inseminar con semen congelado procedente de los conductos deferentes. Por su lado, Pacheco *et al.* (2009) obtuvo porcentajes de fertilidad de 0%, 25% y 16% en alpacas inseminadas artificialmente con semen congelado a las 24, 30 y 36 horas post inducción a la ovulación con macho vasectomizado, respectivamente; finalmente Cárdenas (2002) en un estudio previo obtuvo 12% de gestaciones.

Por otro lado, existen numerosos factores involucrados en la baja tasa de supervivencia de espermatozoides de CSA luego de su congelamiento, el factor más influyente es la velocidad de enfriamiento, la cual tiene que ser adecuadamente lenta para generar una moderada deshidratación de la célula (Mazur, 1984; Boiso, 2001; Hafez, 2002). Pero a la vez, tiene que ser adecuadamente rápida para evitar una exposición prolongada de la célula a condiciones hiperosmóticas crecientes que terminen deshidratándola excesivamente (Holt, 2000; Boiso, 2001). Otro factor importante son los agentes crioprotectores (ACPs), que son componentes químicos hidrosolubles de toxicidad reducida (Boiso, 2001), además suprimen grandes concentraciones de electrolitos, reduciendo el encogimiento celular; aminorando la fracción de la solución de congelación y minimizando la formación de hielo intracelular (Brockbank *et al.*, 2007). Desde el descubrimiento de Polge en 1949 de la eficacia del glicerol como ACP, este ha venido usándose de manera masiva en la criopreservación de semen de bovinos, caninos y primates, principalmente (Rasul *et al.*, 2007). Sin embargo, el glicerol causa toxicidad a los espermatozoides debido a su lenta permeabilidad a la membrana celular y ha demostrado ser contraceptivo en ciertas especies como el ave, por lo que es necesario eliminarlo antes de la IA (Holt, 2000; Watson, 2000; Long *et al.*, 2004). Es por tal razón que surge la necesidad de emplear crioprotectores alternativos como las amidas, caracterizadas por un menor peso molecular y por lo tanto, menor daño osmótico en

comparación con el glicerol. Dentro del grupo amida, la dimetilacetamida (DMA) y el dimetilsulfóxido (DMSO) han sido los más empleados en peces (Lahnsteiner *et al.*, 2000; Tiersch *et al.*, 2004; Vuthiphandchai *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010); conejos (Bamba y Adams, 1990; Iaffaldano *et al.*, 2012), principalmente, aunque hay reportes en aves (Blanco *et al.*, 2000; Mosca *et al.*, 2016; Rakha *et al.*, 2017), primates (Feradis *et al.*, 2001) y mamíferos como el caballo (Santiani *et al.*, 2016), la cabra (Seifi-Jamadi *et al.*, 2017), el koala y el canguro (McClean *et al.*, 2008).

En alpacas, la mayoría de estudios sobre criopreservación de espermatozoides ha empleado glicerol al 2% (0,27 M) – 8% (1,16 M) (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2007, 2010; Banda *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2015; Choez, 2016) y se han obtenido porcentajes de motilidad luego del descongelamiento que varían entre 4% - 31%, siendo estos resultados aún deficientes para lograr tasas de preñez aceptables luego de la IA. Por tal motivo, estos últimos 5 años se han venido realizando más estudios con crioprotectores alternativos como las amidas, Dimetilacetamida (DMA) y Dimetilformamida (DMF) en CSA. Los únicos trabajos detallados en los que se emplea DMA como agente crioprotector para espermatozoides epididimarios de alpaca son los descritos por Mancisidor (2013) quien utilizó DMA al 3.5% obteniendo una motilidad post-descongelación de 32%. De igual manera, Banda *et al.* (2010) utilizaron DMA al 3.5% y obtuvieron 9% de motilidad post-descongelamiento. Por su parte, Canorio (2008) utilizó DMA al 3.5% reportando 34% de motilidad post-descongelación. Las experiencias con DMF son aún más escasas en CSA, se reporta el estudio de Carretero *et al.* (2014) en semen de llama utilizando DMF al 7% y obteniendo un porcentaje de motilidad post-descongelación de 23%, asimismo, está el reporte de Flores *et al.* (2015) empleando en semen de alpaca DMF al 4% y 7% obteniendo motilidad post descongelamiento de 8% y 10%, respectivamente. Debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en los estudios anteriormente mencionados sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca, es necesario evaluar y comparar crioprotectores alternativos del grupo amida, DMA y DMF, a concentraciones distintas y bajo los mismos parámetros.

Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de los tipos (Dimetilacetamida y dimetilformamida) y concentraciones (1%, 3.5% y 7%) de agentes crioprotectores sobre

tres parámetros espermáticos durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. 1. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN CSA

Las particularidades de la cópula de los CSA, la posición sentada o prona, la eyaculación con duración de 10 a 50 minutos y el semen de escaso volumen y gran viscosidad, han incitado a los investigadores a poner en práctica diversos sistemas de colección de semen (Hanzen *et al.*, 2014), las ventajas y desventajas de dichos métodos son detallados a continuación:

a) Electroeyaculación

En principio, implica tranquilizar al animal (Giuliano *et al.*, 2002, 2008) por vía intravenosa con una mezcla de sedante y anestésico general. La colección se realiza con el animal acostado; la sonda del electroeyaculador es introducida sobre la próstata, cuya profundidad es evaluada por medio de un transductor ecográfico. La estimulación ocurre mediante estímulos eléctricos de 0.2 V inducidos a intervalos de 1 segundo durante 3 segundos; el voltaje se va incrementando progresivamente de 2 a 10 V en 6 a 12 minutos (Hanzen *et al.*, 2014). Ese procedimiento implica la presencia de un profesional como mínimo, además de un equipo y protocolo para la estimulación eléctrica adecuada. Sin embargo, no es requerimiento poseer hembras que estén ciclando, la duración de la colecta es menor, puede realizarse durante todo el año y no hay formación de espuma en el eyaculado, como ocurre con la vagina artificial

(Giuliano *et al.*, 2008); aunque lamentablemente el semen puede estar demasiado diluido debido a las secreciones de las glándulas accesorias y llega a contaminarse con la orina (Giuliano, 2012).

b) Aspiración vaginal posterior a la cópula

Es un método no invasivo que consiste en introducir por la vagina un espéculo de uso humano luego de la cópula, se localiza el orificio cervical externa de la cérvix (Neely y Bravo, 1998) con la ayuda de una fuente de luz insertada al espéculo y se colecta el semen a un tubo de vidrio graduado y mantenido a 37°C (Alarcón *et al.*, 2012). No necesita el entrenamiento de los machos ni altera la conducta sexual del macho pero la desventaja es que el semen obtenido está contaminado con presencia de sangre y diluido con las secreciones del tracto genital femenino, siendo desfavorables para la supervivencia de los espermatozoides (Alarcón *et al.*, 2012); además, la cantidad no es representativa de la eyaculación completa (Bravo, 1995; Bravo *et al.*, 2000), ya que la muestra se toma de la vagina y la eyaculación en los camélidos sudamericanos es intracornual.

c) Vagina artificial

La colección de semen con vagina artificial puede ser usada con una hembra receptiva o con un maniquí, por lo que no necesita de un equipo de costo elevado y puede ser llevado a cabo por personal técnico. Este método evita la contaminación del espermatozoos con la orina y permite evaluar la libido del macho (Dávalos *et al.*, 1999). Una dificultad reside en predisponer al macho hacia el maniquí (Adams y Ratto, 2001; Vaughan *et al.*, 2003), para ello se necesita contar con cierta cantidad de días dedicados al entrenamiento de los machos, reportándose porcentajes de rechazo del 10 al 40% por indocilidad o falta de libido (Aller *et al.*, 2003); aunque la exposición a una hembra en estado receptivo durante la colección, hace que en el 82% de veces esta práctica sea exitosa (Aller, 2001). Por otro lado, debido a los movimientos anteroposteriores y de rotación del pene en la vagina artificial, el 16% de colectas resultan

acompañadas de excesiva presencia de espuma, dificultando los exámenes microscópicos y macroscópicos del semen (Aller *et al.*, 2003; Von Baer y Hellemann, 1998; Giuliano *et al.*, 2008).

La duración de la eyaculación, la dificultad de mantener la temperatura constante a nivel de la vagina artificial, el escaso volumen de semen y su contacto relativamente largo con el aire que inclusive pueden provocar la posible evaporación del líquido espermático durante la colecta, constituyen otros de los factores que posiblemente alteren la calidad del esperma colectado (Hanzen *et al.*, 2014).

d) Desviación de los conductos deferentes

La técnica se realizó en alpacas con la finalidad de obtener espermatozoides sin las secreciones que le brindan las glándulas anexas obteniendo muestras sin viscosidad de la cola del epidídimo (Quintano, 2002). El método quirúrgico consiste en desviar hacia el muslo (cara interna) los conductos deferentes dejando una abertura en piel para la colección continua de muestras sin requerir de una hembra en celo (Paricahua, 2001; Quintano, 2001). La desventaja es que con el tiempo esta técnica inutiliza reproductivamente al macho; además, es necesario la intervención de un profesional para la cirugía y cuidados post operatorios.

2.2. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO

Existen protocolos detallados de recuperación de espermatozoides del epidídimo, principalmente, en bovinos; sin embargo, en CSA son pocas las experiencias con muestras espermáticas obtenidas mediante esta técnica, siendo presentado por primera vez en el reporte de Morton *et al.*, (2007) quienes demostraron que es factible recuperar espermatozoides epididimarios y criopreservarlos a pesar de un largo intervalo entre la castración y la recuperación. Morton *et al.* (2007, 2010), Canorio (2008) y Kershaw-Young y Maxwell (2011) describieron el “método del picadillo”, que consiste en separar la cola del epidídimo e ir diseccionando el tejido conectivo, para luego limpiar los vasos sanguíneos de su superficie. Una vez limpia es colocada sobre una placa Petri

y se empiezan a realizar cortes finos con un bisturí estéril, para permitir la liberación de los espermatozoides en un medio especial durante un tiempo determinado. Posteriormente, la muestra es centrifugada para eliminar restos que pudieran quedar. Los efectos de la centrifugación en los espermatozoides de camélidos no se han investigado exhaustivamente; sin embargo, Ferré *et al.* (2000) informaron que la centrifugación (300 g, 10 min) fue altamente perjudicial para la longevidad de los espermatozoides de semen fresco de llama. Asimismo, Guerrero (2006) menciona que no es adecuado centrifugar la muestra y que se exponga a la sangre ya que puede afectar la viabilidad de espermatozoides epididimarios de bovino. Por su lado, Restrepo *et al.* (2016) demostraron que incluso bajos niveles de fuerza de centrifugación, logran alterar la movilidad espermática, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana interna mitocondrial de los espermatozoides equinos. Por lo tanto, la supervivencia post-descongelación de los espermatozoides epididimarios de alpaca puede mejorarse mediante la eliminación de la etapa de centrifugación previa al congelamiento (Morton *et al.*, 2007); como lo describen detalladamente Mancisidor (2013), Terreros (2015) y Choez (2016) como el “método de incisiones”, la diferencia fundamental con el método anterior son los cortes seriados que se realizan longitudinalmente sobre la cola del epidídimo para que los espermatozoides puedan ser liberados a un medio especial adicionado; se espera un par de minutos para que los espermatozoides floten en el medio y finalmente se colecta la suspensión utilizando una micropipeta y un tubo Eppendorf. También es posible la recuperación si sólo se prensa suavemente con las pinzas sin realizar incisiones, como lo describió Banda *et al.* (2010).

Los espermatozoides epididimarios de alpaca proporcionan un modelo más sencillo para establecer protocolos de criopreservación que con semen eyaculado al eliminar los efectos del plasma seminal viscoso (Morton *et al.*, 2007). Además, la colección de semen a nivel de los conductos del epidídimo constituye un medio para aumentar la motilidad progresiva y la calidad del acrosoma (Ratto *et al.*, 1999); sin embargo, no es posible conseguir muestras sucesivas de un mismo animal mediante esta técnica (Giuliano *et al.*, 2012).

2.3. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

El eyaculado de CSA presenta un volumen reducido, alta viscosidad, poca concentración de espermatozoides y bajo porcentaje de motilidad; además los parámetros son muy variables, actualmente se ha demostrado que existen variaciones entre y dentro de individuos (Morton *et al.*, 2008), posiblemente debido a la influencia de factores medioambientales y de la propia especie (Tibary y Vaughan, 2006). Es probable que esto afecte la obtención de muestras de buena calidad para ser criopreservados e inseminados posteriormente.

La mayor parte del eyaculado de los camélidos sudamericanos lo constituye el plasma seminal, en el 88,5% y el resto son espermatozoides, 11,5% (Garnica *et al.*, 1993). El volumen del eyaculado es variable entre macho y macho, dependiendo también del número de eyaculaciones al día y del método de colección, siendo mayor el volumen de semen recogido mediante vagina artificial que por electroeyaculación (Tibary y Memon, 1999). Está comprendido entre 0,5 y 3,5 mL, con variaciones importantes que oscilan entre 0,6 a 7,0 mL (Fowler, 1989; Garnica *et al.*, 1995). El color va de blanco lechoso a grisáceo, dependiendo de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas accesorias (Tibary y Memon, 1999). En la alpaca, el pH del semen está comprendido entre 7,1 y 8,3 y en la llama, entre 7,2 y 8,6 (Hanzen *et al.*, 2014).

El semen de los camélidos sudamericanos tiene la particularidad de ser muy viscoso (Fernández Baca y Novoa, 1968; Sumar, 1991), lo que hace difícil su manipulación (Por ejemplo, pipetearlo o teñirlo en un portaobjetos) y su evaluación microscópica (Determinación de concentración y motilidad espermática). Dicha viscosidad ha sido atribuida a los mucopolisacáridos presentes en la secreción conferida por las glándulas sexuales accesorias de los CSA (Gonzales *et al.*, 2003). Hace un par de años, se identificó la Mucina 5B, una proteína, como la principal responsable de la viscosidad en el plasma seminal de la alpaca; igualmente, se encontró que plasmas seminales con elevada viscosidad muestran concentraciones cinco veces mayores que aquellos con baja viscosidad (Kershaw-Young y Maxwell, 2012a). El grado de viscosidad tiene dos efectos prácticos; dificulta la separación de espermatozoides de la fracción líquida del eyaculado y es responsable del movimiento oscilatorio y de que no haya motilidad

progresiva, como en otras especies domésticas (Sumar y García, 1986; Giuliano *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2003). Sin embargo, aún no se conoce con exactitud su papel fisiológico. Se sabe que en CSA, el semen se deposita dentro del cuerno alrededor de 2 días previos a la ovulación, este tiempo puede justificar que los espermatozoides queden atrapados en el coágulo cumpliendo la función fisiológica del “depósito cervical espermático” como sucede en otras especies de rumiantes (Sumar, 2002). Asimismo, su elevada viscosidad impide el movimiento progresivo activo del espermatozoide, generando poco gasto energético y que se produzcan menos radicales libres. Por otra parte, una vez colectado el semen, se licuefacta progresivamente al cabo de las $23 \pm 1,2$ horas, entre 8 a 48 horas, después de la colecta (Garnica *et al.*, 1993; Bravo y Johnson, 1994).

Dentro de las características microscópicas del semen, la concentración es un parámetro muy variable, fluctuando de 0,01 a 600 millones de espermatozoides por mL (Hanzen *et al.*, 2014), y está en función de la edad del macho, el método de colección y el volumen colectado (Tibary y Vaughan, 2006); cabe señalar que la frecuencia de colecciones no tiene efectos sobre esta variable (Hanzen *et al.*, 2014). Otra característica importante es el porcentaje de motilidad, pues en la mayoría de casos es inferior al 60%; la mayoría de espermatozoides de un eyaculado no diluido realizan movimientos oscilatorios sobre sí mismos y solamente muestran movimiento progresivo activo entre el 5 y 10% de espermatozoides (Garnica *et al.*, 1993, 1995; Bravo *et al.*, 1997; Ordóñez *et al.*, 2013). Morton *et al.* (2007) mencionan que los espermatozoides epididimarios mostraron el movimiento progresivo hacia adelante inmediatamente después de la recuperación, en contraste con la motilidad oscilatoria de los espermatozoides eyaculados. Por su parte, Giuliano *et al.* (2012) afirman que se puede evaluar la motilidad espermática en muestras provenientes de la cola del epidídimo, ya que dichos espermatozoides presentan motilidad progresiva.

Sobre los estudios de caracterización morfométrica del espermatozoide de alpaca, Buendía *et al.* (2002) reportaron 5 categorías de acuerdo a la morfometría de la cabeza: normal 47%, grande 29%, pequeño 20%, piriforme 3% y redondo 1%. Evangelista *et al.* (2015), determinaron que la medida de la longitud de la cabeza de espermatozoides normales es de $5.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$ y señalan que las categorías descritas por Buendía *et al.*

(2002) no son suficientes para establecer los tipos de cabeza presentes en espermatozoides de alpaca, además que las formas especiales como macro y microcefalia no necesariamente se encuentran dentro de los límites señalados para las formas generales. En el estudio de Evangelista *et al.* (2015) con espermatozoides de alpacas macho de fertilidad comprobada, los porcentajes de defectos en cabeza están en un rango de 47% - 57% y los porcentajes de defectos en pieza media y cola varían entre 3% - 62%; además, afirmaron una relación entre la fertilidad del macho y la morfometría del espermatozoide, encontrando en su estudio porcentajes de formas normales de 44% para cabeza y pieza media, y 38% para cola. Por otra parte, la calidad del semen es influenciada por la estación y por el método de colección, siendo mucho mejor en invierno que en verano y obteniendo una muestra de mayor calidad mediante electroeyaculación en comparación con la vagina artificial (Giuliano *et al.*, 2008).

2.4. TRASCENDENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO

Actualmente existen muchos métodos para eliminar la viscosidad del plasma seminal con la finalidad de facilitar la manipulación de la muestra en el laboratorio, se han utilizado enzimas como la collagenasa, hialuronidasa, fibrinolisisina y tripsina para este fin, así como la técnica de aspirado y eyectado múltiple utilizando una jeringa de tuberculina; sin embargo, todavía no es claro si existe un efecto sobre la capacidad del espermatozoide para fecundar utilizando alguna técnica anteriormente mencionada. En consecuencia, la recuperación de espermatozoides del epidídimo resulta una buena opción para obtener muestras sin plasma seminal aunque debe tenerse en cuenta si esto influye sobre los parámetros espermáticos luego de la descongelación. Según Kershaw-Young y Maxwell (2011), al igual que en otras especies, la adición de 10% de plasma seminal después de la descongelación de una muestra de espermatozoides epididimarios de alpaca puede mejorar su función, integridad y fertilidad post-descongelamiento, lo que justifica una investigación adicional. Sin embargo, Rodríguez (2009) no encontró un efecto protector del plasma seminal al espermatozoide que justifique su uso en alpacas.

Por otro lado, los espermatozoides epididimarios poseen capacidad de fecundación, es decir, están funcionalmente competentes al encontrarse en un nivel de maduración final

(Reyes-Moreno *et al.*, 2002; Barrios, 2002; Canorio, 2008) lo que hace posible utilizarlos como modelo experimental en la criopreservación espermática y posteriormente ser usados en la IA y fecundación *in vitro*, o en todo caso para recuperar el germoplasma de animales de gran valor genético o en peligro de extinción (Reyes-Moreno *et al.*, 2002; Anel *et al.*, 2002).

2.5. FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA

Previo a la fecundación es necesario que el espermatozoide experimente la maduración dentro del epidídimo, seguido de la capacitación y la reacción acrosomal para lograr la penetración del óvulo.

2.5.1. MADURACIÓN EPIDIDIMARIA

El epidídimo desempeña un rol importante en el desarrollo de un espermatozoide funcionalmente competente, los espermatozoides que se encuentran fuera del epidídimo tienen movilidad baja o nula y no son capaces de incorporarse a la zona pelúcida. Adquieren movilidad progresiva convirtiéndose en células funcionalmente maduras durante el paso a través del epidídimo (Turner, 1979; Cooper, 1998). Las células epiteliales que recubren el conducto epididimal forman un entorno de fluido luminal al secretar y absorber activamente moléculas pequeñas (azúcares, electrolitos, etc.) y macromoléculas (proteínas, glicoproteínas, etc.). Por lo tanto, las secreciones del conducto y los contenidos derivados de los testículos proporcionan un entorno específico en el que los espermatozoides funcionalmente inmaduros sufren alteraciones para alcanzar el proceso de maduración (Tulsiani, 2006).

2.5.2. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La capacitación espermática se realiza dentro del tracto genital de la hembra, es una fase lenta en el que se da la reestructuración de la membrana plasmática y la modificación de su funcionalidad con el fin de fecundar al ovocito (Harrison y Gadella, 2005); dependiendo de la especie, la capacitación ocurre en el útero o en el oviducto, específicamente la región ístmica; mientras avanza este proceso, los espermatozoides experimentarán cambios bioquímicos como: 1) Incremento de la adenilciclasa y AMPc; 2) Incremento del pH dentro de la célula (Parrish *et al.*, 1994); 3) Aumento del ingreso de Ca^{2+} (Boerke *et al.*, 2008) y 4) Reestructuración de la membrana plasmática de los espermatozoides y fosforilación de proteínas (Visconti *et al.*, 2010).

Al interior del epidídimo existen niveles bajos de bicarbonato (HCO_3^-) que mantienen al espermatozoide “no capacitado”; sin embargo, en el fluido oviductal los niveles de HCO_3^- son altos, favoreciendo la capacitación (Rodríguez- Martínez *et al.*, 1990); es así que el HCO_3^- va actuar activando la adenilciclasa incrementado de esta manera la concentración de AMPc dentro de la célula; activando la cascada de señalización de la proteinkinasa A (PKA) quien está encargada de regular el metabolismo de los lípidos; de esta manera, se producirá cambios en la composición lipídica de la membrana del espermatozoide dando como resultado aumento de su fluidez (Fraser *et al.*, 2005).

Asimismo, el proceso de capacitación espermática es dependiente de Ca^{2+} , encontrando un aumento en los espermatozoides capacitados; su entrada activa la adenilciclasa que a su vez activa la PKA la cual favorece la fosforilación de algunas proteínas espermáticas (Visconti *et al.*, 1995). Esta cascada de activación vía AMPc modificará también el metabolismo del espermatozoide favoreciendo la hiperactivación espermática, es decir, los espermatozoides presentan alta motilidad (Aitken, 1995; Flesch y Gadella, 2000); sólo los espermatozoides que consiguieron capacitarse presentarán motilidad hiperactivada y serán sometidos a una reacción acrosómica fisiológica, para poder adquirir la capacidad de fecundación (De Lamirande *et al.*, 1993). Se han realizado trabajos de capacitación *in vitro* de espermatozoides de alpaca, habiéndose logrado el proceso de capacitación en 3 horas bajo condiciones de laboratorio, los espermatozoides fueron incubados en medios especiales como el medio Ham F10 y se empleó albúmina sérica bovina como agente para la capacitación, esta albúmina tiene la propiedad de

remover el colesterol generando modificaciones en la fluidez de la membrana similar al proceso de capacitación (Manosalva, 2003; Uriondo *et al.*, 2008). Por otro lado, los espermatozoides del conducto deferente podrían estar precapacitados puesto que no requieren la licuefacción o eliminación de algunas moléculas y sustancias decapacitantes absorbidas del plasma seminal, como sucede con las muestras de eyaculados durante el proceso de capacitación (Roldan, 1996; Chang, 1984), es así que la capacitación espermática se acelera en espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes.

2.5.3. REACCIÓN ACROSOMAL

La reacción del acrosoma es un evento de exocitosis que se inicia luego de la unión del espermatozoide al ovocito y es necesario para que logre penetrarlo; la membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa destruyéndola y formando espacios en múltiples sitios para la liberación del contenido acrosomal, las enzimas hidrolíticas que se liberan del acrosoma cumplen un rol fundamental en la fecundación del óvulo, ya que están encargadas de eliminar la estructura de la zona pelúcida y permitir al espermatozoide penetrarla gradualmente y ubicarse en el espacio perivitelino (Tulsiani *et al.*, 1998; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Asimismo, la habilidad de fecundación y la reacción acrosómica del espermatozoide se mantienen por los niveles adecuados de ROS *in vivo* los cuales proporcionan una mejor fluidez de la membrana, siendo importante para una óptima funcionalidad del espermatozoide en esta fase (Bucak *et al.*, 2010).

2.6. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo ha demostrado ser una herramienta precisa y reproducible para el análisis de la función de los espermatozoides, además del alto rendimiento que esta técnica puede proporcionar en términos del análisis de miles de células por segundo (Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Cheuquemán *et al.*, 2012). Consiste en examinar y

cuantificar tres o más características de una célula, lo que posibilita un análisis simultáneo multiparamétrico. La metodología citométrica de flujo se cuenta entre los procedimientos semicuantitativos más eficaces, caracterizándose por una elevada capacidad de repetición, de estandarización y de objetividad (Bush y Waberski, 2007).

En el citómetro de flujo, las células se dispersan en una suspensión líquida y fluyen una a una a través del rayo láser (*light amplification, by stimulated emission of radiation*), que es indispensable para mantener un flujo constante. Las células en suspensión son inyectadas a través de un chorro de líquido en forma de anillo que las envuelve (Gómez y Casas, 2014). La presión ejercida sobre este envoltorio líquido permite que el chorro de la muestra sea cada vez más estrecho, hasta disminuir su diámetro y enfocararlo en el agujero de salida, que normalmente es de unas 76 micras, para que las células sean estimuladas uniformemente por el rayo láser. Las células reflejan la luz del láser, que incide sobre ellas en ángulos mínimos de 0 a 20 (dispersión frontal), relacionados con el área de superficie celular o tamaño de la célula, y con un ángulo de 90° (dispersión ortogonal) para la complejidad celular o la granulación celular como las características del núcleo, granulación del citoplasma, etc (Raskin y Meyer, 2010). La luz reflejada o emitida por las células es sistematizada, y la parte óptica con lentes y filtros las organiza y visualiza en una pantalla, donde grupos celulares, según el diagrama que ocupan, corresponden a determinado grupo celular, en el que por coloraciones y fluorescencia es factible identificarlas (Gómez y Casas, 2014). Se produce fluorescencia cuando una molécula que puede estimularse con luz de determinada longitud de onda regresa al estado básico (sin estimular) y por ello emite luz de mayor longitud de onda. Mediante la presencia e intensidad de la fluorescencia pueden sacarse conclusiones sobre el estado morfológico o funcional de compartimentos celulares (Bush y Waberski, 2007).

La ventaja de esta técnica estriba en que se caracteriza cada célula en particular, sin perder información en la evaluación de los datos. Estos datos unitarios se depositan y son tratados en el futuro en lugar del dato de un valor medio correspondiente a una población celular (Bush y Waberski, 2007).

Por otro lado, los ensayos *in vitro* estándar actuales que miden los aspectos estructurales y funcionales básicos de la fisiología del espermatozoide mediante citometría son: (1) viabilidad espermática; (2) integridad de la membrana plasmática; (3) potencial de la membrana mitocondrial; (4) integridad acrosomal; (5) interacciones entre el espermatozoide y

el óvulo, la penetración de ovocitos sin zona y la fertilización de ovocitos intactos (Mortimer, 1985; Henry *et al.*, 1993; Critser y Noiles, 1993).

2.6.1. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE

Consiste en observar a través de un microscopio a 40X una pequeña muestra de espermatozoides obtenidos del epidídimo o de semen eyaculado (10 μ L) colocada sobre un portaobjetos y cubierta con una lámina cubreobjetos, se procede a visualizar los espermatozoides móviles al menos en 5 campos distintos y determinar un porcentaje sobre el total de espermatozoides contados. La motilidad es un parámetro utilizado tradicionalmente para estimar la calidad seminal en distintas especies; sin embargo, según Bravo *et al.* (2002) no sería un buen indicador de la calidad seminal en CSA, al no existir motilidad progresiva sino un movimiento oscilatorio, en muestras de semen obtenidas por eyaculación.

2.6.2. EVALUACIÓN DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA

Realmente el concepto de viabilidad en una célula como el espermatozoide implicaría que fuese capaz de cumplir su función, es decir, fecundar el ovocito. Esa comprobación conlleva técnicas como la fecundación *in vitro* o, al menos, la unión a la zona pelúcida (*Zona Binding Assay* o ZBA) para estimar el porcentaje de espermatozoides que se unen a los ovocitos. Pero normalmente, cuando se utiliza el término de viabilidad de semen, se hace referencia a la totalidad de la membrana plasmática (y en su mayoría, también de la membrana acrosomal) de los espermatozoides (Abecia y Forcada, 2010).

Existen muchos colorantes fluorescentes que se pueden usar solos o combinados en la determinación de la viabilidad espermática. Uno de los colorantes fluorescentes más usados es el yoduro de propidio, que sólo penetra en el interior de las células con membranas dañadas. Este colorante, que presenta fluorescencia roja, tiene afinidad por el ADN por lo que tiñe el núcleo celular (Martínez y Miranda, 2010).

Por otro lado, la integridad de las membranas acrosómicas se determina mediante la capacidad de fijación de lectinas (proteínas fijadoras de carbohidratos) en determinados compartimentos del acrosoma. Las lectinas se acoplan para detectar la fijación al FITC fluorescente (fluoresceín-isotiocianato). Las lectinas Peanut Aglutinina, *Pisum sativum* Aglutinina y *Phaseolus vulgaris* Aglutinina (PNA, PSA, PHA) se fijan, de acuerdo con la especie animal, a la membrana acrosómica externa o interna, o bien al contenido de la matriz acrosómica, descubriendo de esta forma lesiones en la membrana acrosómica (Bush y Waberski, 2007) por la fluorescencia verde observada. La lectina de PNA entra en contacto con los terminales de beta-galactosa localizados al interior de la membrana acrosómica externa, mientras que la lectina de PSA se une a las glicoproteínas de la matriz acrosómica (Silva y Gadella, 2006; Celeghini *et al.*, 2010).

Estas lectinas se han utilizado para evaluar la integridad del acrosoma en humanos y carneros. En CSA, Cheuqueman *et al.* (2013) evaluaron la viabilidad y la integridad del acrosoma en espermatozoides eyaculados de alpaca recogidos por vagina artificial con FITC-PSA y PI, mientras que Ugarelli *et al.* (2015) emplearon FITC-PSA y FITC-PNA en distintas concentraciones con el fin de valorar la integridad del acrosoma en espermatozoides congelados/descongelados obtenidos por lavado de esperma post-coital. Recientemente, Santiani *et al.* (2016) evaluaron la integridad del acrosoma y la integridad/viabilidad del acrosoma en espermatozoides epididimarios mediante FITC-PSA/PI y FITC-PNA/PI. Las concentraciones utilizadas por Santiani *et al.* (2016) fueron considerablemente más bajas (0.5 y 2.5 µg/mL para FITC-PSA y FITC-PNA, respectivamente) en comparación a las concentraciones finales de lectinas que han venido siendo usadas en alpacas (50 a 100 µg/mL) reportado por Morton *et al.* (2007) y Cheuqueman *et al.* (2013) porque la citometría de flujo con imágenes es más sensible que la citometría de flujo tradicional (Ugarelli *et al.*, 2015). Ambas lectinas conjugadas podrían usarse para valorar la integridad acrosomal de muestras espermáticas provenientes del epidídimo de alpaca (Santiani *et al.*, 2016).

Existen otros muchos colorantes fluorescentes que se pueden usar para valorar la viabilidad espermática, como por ejemplo el SYBR-14 (verde) combinado también con el yoduro de propidio o bien con el homodímero de etidio (rojo) (Abecia y Forcada, 2010).

2.6.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS MITOCONDRIAS

Los espermatozoides de mamíferos dependen principalmente de dos vías metabólicas para obtener energía: la glucólisis anaeróbica y la fosforilación oxidativa mitocondrial (Piomboni *et al.*, 2012; Ferramosca *et al.*, 2014); la glucólisis se produce principalmente en la zona del flagelo, mientras que la fosforilación oxidativa se produce en las mitocondrias, que se localizan exclusivamente en la parte media del espermatozoide y proporciona la energía necesaria para mantener los movimientos flagelares. Las mitocondrias del espermatozoide son organelas únicas que participan en muchos procesos cruciales, como la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) a través del mecanismo sofisticado de la fosforilación oxidativa (Piomboni *et al.*, 2012; Ferramosca *et al.*, 2014); este proceso requiere el funcionamiento coordinado de dos componentes principales: la cadena respiratoria y la ATP-sintasa, ambas ubicadas en la membrana mitocondrial interna (Figura). La cadena respiratoria o cadena de transferencia de electrones a través de los complejos I, II, III y IV y de dos moléculas transbordadoras de electrones (ubiquinona y citocromo c) realiza un bombeo de protones concomitante que establece el potencial de membrana mitocondrial (PMM) o la fuerza motriz del protón (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011); los protones se bombean desde el espacio de la matriz al espacio intermembrana, creando un pH sustancial y un gradiente eléctrico o de carga (PMM) a través de la membrana interna mitocondrial, su impermeabilidad crea la diferencia de potencial electroquímico de protones; finalmente, estos protones vuelven a entrar a favor de la gradiente en el espacio de la matriz por el complejo V a través de la ATP-sintasa, impulsando la síntesis de ATP utilizando la energía libre derivada de la disipación fisiológica de la fuerza motriz protónica a través de la membrana mitocondrial interna (Boyer, 2001; Cottet-Rousselle *et al.*, 2011) en el proceso denominado fosforilación oxidativa (Luo *et al.*, 2013).

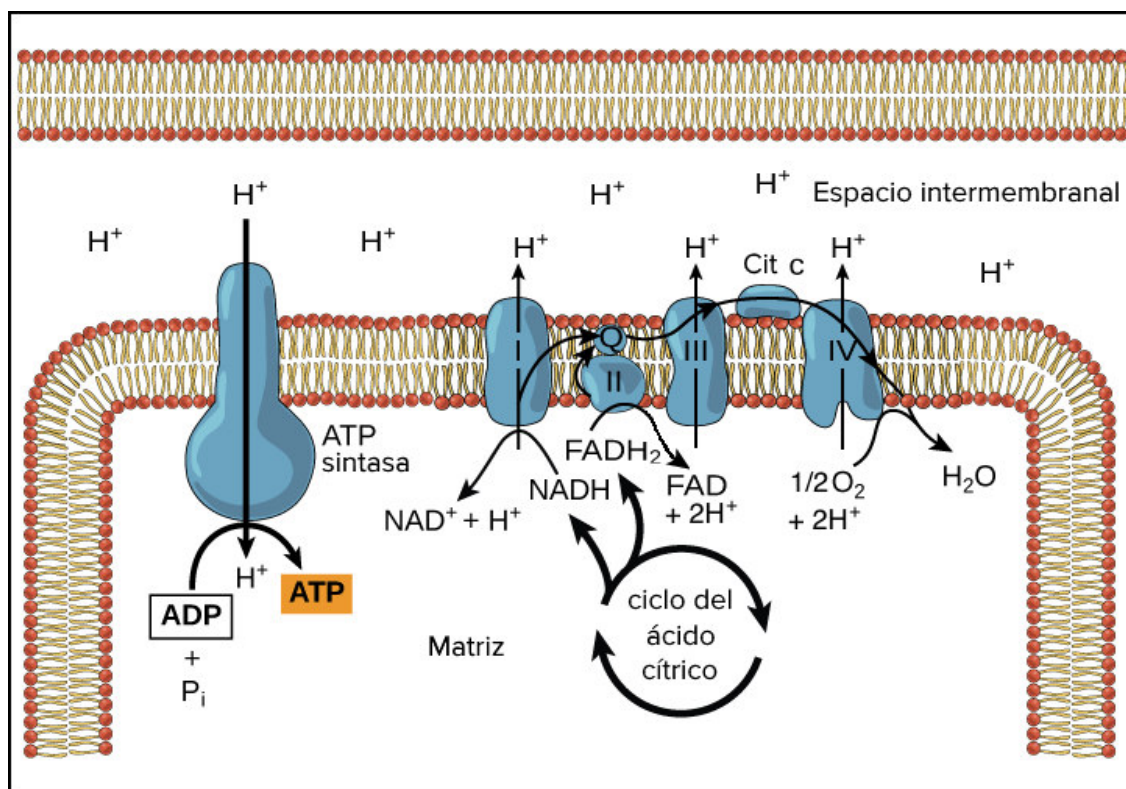


Fig. 1 Sistema de fosforilación oxidativa. El sistema de fosforilación oxidativa está compuesto por cinco complejos de múltiples subunidades distintas (Complejo I, II, III, IV y V). La cadena de transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV bombean activamente protones de la matriz al espacio intermembrana, creando un pH sustancial y un gradiente eléctrico o PMM, estos protones finalmente vuelven a entrar en el espacio de la matriz a través de la ATPsintasa, impulsando la síntesis de ATP (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011)

Se han desarrollado diversos enfoques metodológicos para evaluar las funciones mitocondriales; como los ensayos espectrofotométricos (Ruiz-Pesini *et al.*, 1998; 2000), los métodos polarográficos (Ferramosca *et al.*, 2012; 2008; 2015) o la citofluorimetría (Evenson *et al.*, 1982; Auger *et al.*, 1989; 1993; Kramer *et al.*, 1993; Kasai *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2002; 2004; Gallon *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2011). En particular, la espectrofotometría se usa para medir la actividad de enzimas específicas involucradas en el metabolismo mitocondrial; la polarografía mide la tasa de cambio en la concentración de oxígeno en la solución y, dado que el oxígeno es el receptor de electrones final de la cadena respiratoria, proporciona una medición directa de la actividad mitocondrial; la citometría de flujo, en cambio, puede usarse para

estimar el PMM a través de la membrana interna mitocondrial, que es un método indirecto para evaluar la actividad respiratoria mitocondrial (Moscatelli *et al.*, 2017).

La medición del PMM es una alternativa más objetiva y útil para la medición de la calidad del semen (Santiani *et al.*, 2016) y se monitorea comúnmente usando sondas fluorescentes catiónicas que se acumulan en las mitocondrias, preferentemente en la matriz mitocondrial (Cottet-Rouselle *et al.*, 2011) inducida por el gradiente eléctrico transmembrana (PMM); las sondas MitoTracker (MitoTracker Orange, MitoTracker Red y MitoTracker Deep Red) son una serie de tinciones selectivas que permeabilizan las células, se difunden pasivamente por medio de la membrana plasmática y al ser fluorescentes catiónicos son atraídos por el potencial negativo a través de la membrana mitocondrial interna, por lo tanto, se acumulan preferentemente en las mitocondrias polarizadas porque son altamente eficientes al cruzar las membranas hidrofóbicas (Yousif *et al.*, 2009) y emiten fluorescencia en diferentes longitudes de onda, según su naturaleza (Haugland, 2002). Además, las sondas MitoTracker se unirían covalentemente a los grupos tiol libres en las proteínas mitocondriales y, por lo tanto, se cree que se retienen después de la fijación celular (Poot *et al.*, 1996).

El PMM se ha evaluado en el humano (Evenson *et al.*, 1982; Auger *et al.*, 1989; 1993; Kramer *et al.*, 1993; Kasai *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2002; 2004; Gallon *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2009; Amaral y Ramalho-Santos, 2010; Sousa *et al.*, 2011), principalmente, y el toro (Hallap *et al.*, 2005) y recientemente se ha reportado en alpacas por Cheuqueman *et al.* (2013) y Santiani *et al.* (2016); se ha utilizado MitoTracker CMXRos y MitoTracker Deep Red FM en la valoración del PMM en espermatozoides epididimarios de alpaca (Santiani *et al.*, 2016). A pesar de que el MitoTracker Deep Red FM se ha descrito para evaluar la función mitocondrial como marcador de la viabilidad de los espermatozoides de bovinos (Hallap *et al.*, 2005), el MitoTracker CMXRos podría constituir una tinción valiosa para el análisis de la morfología y función mitocondrial en espermatozoides epididimarios de alpaca (Santiani *et al.*, 2016).

2.7. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

A principios de la década de los 90's, el uso de la inseminación artificial (IA) se expandió rápidamente, de modo que entre los años 1930 y 1940, millones de caballos, vacas y ovejas alrededor del mundo se criaban utilizando la IA. Sin embargo, pronto surgieron nuevos retos debido a la necesidad de desarrollar métodos para almacenar el semen durante períodos de tiempo más largos, a través de la adición de componentes en los medios para extender la viabilidad del espermatozoide y disminuir los requisitos metabólicos de estas células, enfriándolos a temperaturas inferiores a 0°C (Gao *et al.*, 1997). Es así como Polge *et al.* (1949) lograron resolver este problema adicionando un agente protector (glicerol) para el semen congelado. Desde esa época se ha expandido el uso general de agentes crioprotectores logrando que la criopreservación de semen sea usada mundialmente como una herramienta esencial en los programas de mejoramiento animal, donde se realiza inseminación artificial con semen congelado. Además, la criopreservación de espermatozoides constituye un método para mantener la diversidad genética en especies con amenaza de extinción, especialmente de parques zoológicos que son especies candidatas para programas de cría en cautividad (Ballou, 1992). Sin embargo, existe un daño celular durante la criopreservación de semen que puede ser atribuido a diversos factores como los cambios de temperatura, aparición de cristales y formaciones de hielo dentro de la célula, estrés oxidativo, cambios en la membrana espermática, cambios en el ADN, niveles tóxicos de agentes crioprotectores y estrés osmótico (Watson, 1995, 2000; Gao *et al.*, 1997). Los espermatozoides parecen ser sensibles al estrés osmótico cuando se le añaden y retiran cantidades molares de agentes crioprotectores y son afectados por las alteraciones en las concentraciones de soluto durante la congelación (Gao *et al.*, 1997; Watson, 2000).

2.7.1. FACTORES CRÍTICOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Para la mayoría de las especies de mamíferos la fertilidad se ve claramente reducida por el protocolo de criopreservación en comparación con el semen fresco, a excepción del semen congelado de toro, el cual es usado comercialmente desde hace varias décadas

por obtener resultados de concepciones comparables o mejores que con el apareamiento natural. Indiscutiblemente la congelación de espermatozoides produce una fertilidad reducida debido a la pérdida de viabilidad de los espermatozoides y al deterioro de la función en la población de sobrevivientes; asimismo, la criopreservación causa estrés potencialmente dañino a los espermatozoides: en primer lugar, el cambio de temperatura; en segundo lugar, el estrés osmótico y tóxico por la exposición a concentraciones molares de crioprotectores; y en tercer lugar, la formación y disolución del hielo en el medio extracelular (Watson, 2000).

Durante la criopreservación existen dos periodos críticos para la supervivencia celular que son: la fase inicial de enfriamiento y la descongelación o calentamiento (Mazur, 1984). Ambas fases son responsables de la supervivencia espermática debido a que las células que han sobrevivido al enfriamiento a -196°C aún enfrentan el desafío del calentamiento y la descongelación, y por lo tanto deben atravesar dos veces la zona de temperatura crítica que, en general, está comprendida entre -15°C a -60°C (Salamon y Maxwell, 2000).

La velocidad de enfriamiento influye significativamente sobre la supervivencia celular (Brockbank *et al.*, 2007). Es así que, enfriar el semen de ungulado demasiado rápido, entre 30°C y 0°C , induce estrés fatal en algunos espermatozoides, proporcional a la velocidad con qué se enfría y el rango de temperatura. Este fenómeno, conocido como “choque de frío” (Watson, 1981), también afecta de manera variable a otras especies, es así que los espermatozoides de toro, carnero, jabalí y caballo son muy sensibles al choque de frío, mientras que los espermatozoides de perros y gatos son moderadamente sensibles y los espermatozoides de conejo y humanos son relativamente resistentes (Critser *et al.*, 1988; Watson, 1981); es por ello que el enfriamiento en este rango antes de la criopreservación se realiza con cuidado (Watson, 2000). Aunque, incluso con un enfriamiento lento, el cambio de temperatura induce estrés en las membranas y puede continuar por debajo de 0°C pero según Watson (2000) en estudios preliminares no pudieron mostrar lesiones por choque de frío en espermatozoides de toro por debajo de 0°C . Sin embargo, es conocido que el mayor cambio de fase ocurre cerca de 5 a 15°C (Drobnis *et al.*, 1993) y este podría ser el rango de temperatura principal para lesiones dependientes de la temperatura (Watson, 2000).

En suspensiones celulares, cuando se reduce la temperatura cerca de -5 y -10°C, se empieza a solidificar el medio extracelular formándose cristales de hielo (Gao *et al.*, 1997), a pesar de ello, la membrana plasmática funciona como barrera para impedir el crecimiento del hielo hacia el medio intracelular, permaneciendo el espermatozoide suspendido en la parte líquida dentro de la célula (Watson, 1979). El agua pura del medio extracelular se cristaliza como hielo dejando a los solutos en la fracción líquida restante y la fuerza osmótica de la solución aumenta, esto ocasiona una difusión de líquido intracelular al medio extracelular, es decir, los espermatozoides se van deshidratando para conservar la estabilidad osmótica del medio extracelular (Amann y Pickett, 1987; Medeiros *et al.*, 2002). Estos efectos que pueden causar daño celular como resultado de la concentración de solutos han sido caracterizados colectivamente por Mazur *et al.* (1972) como "efecto solución". Se sabe que el tiempo de exposición a tal efecto debe reducirse para conseguir una adecuada supervivencia celular, por tal motivo la velocidad de enfriamiento debe ser adecuadamente rápida para evitar que esta condición hiperosmótica creciente genere la deshidratación excesiva del espermatozoide. Pero a su vez, la velocidad de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta para favorecer la salida del agua del medio intracelular hacia el extracelular por ósmosis, evitando que se forme hielo intracelular que resultaría fatal para la célula (Holt, 2000; Watson, 2000).

2.7.2. AGENTES CRIOPROTECTORES

Además de evitar la formación de numerosos y grandes cristales de hielo intracelular, la mayoría de las células requieren la adición de solutos o agentes crioprotectores (ACPs). Hace más de 60 años fue descubierto el papel del glicerol como un ACP efectivo para los espermatozoides y los eritrocitos humanos en Mill Hill, Inglaterra (Polge *et al.*, 1949). Este descubrimiento abrió las puertas a un nuevo tipo de estudio criobiológico porque se habían identificado nuevas variables que podrían usarse en la optimización de los protocolos de criopreservación (Walters *et al.*, 2009).

Son clasificados tradicionalmente en dos simples grupos, los penetrantes y los no penetrantes:

- **ACPs penetrantes o de acción intracelular**

Se caracterizan por tener menor peso molecular en comparación al segundo grupo de ACPs, por lo que penetran a la célula de manera uniforme y sin causar estrés osmótico. Una vez que ingresan al medio intracelular sustituyen el volumen de agua que va saliendo al medio extracelular causando una deshidratación celular adecuada y evitando el colapso por una deshidratación excesiva sobre todo cuando la velocidad de enfriamiento es lenta. Además este mecanismo atenúa el incremento del medio hipertónico extracelular y evita la expansión de hielo al interior de la célula (García y Vila, 1984; Medeiros *et al.*, 2002). Dentro de este grupo el más usado ha sido el glicerol, seguido del etilenglicol y actualmente, los del grupo amida, destacando el dimetilsulfóxido, dimetilacetamida y dimetilformamida. Los ACPs penetrantes, en función de su concentración, podrían causar toxicidad a los espermatozoides, produciendo daño a la membrana plasmática y baja motilidad (Medeiros *et al.*, 2002). Se sabe que el glicerol posee propiedades anticonceptivas a concentraciones tóxicas en algunas especies como el ave, además interactúa con el metabolismo de los espermatozoides, alterando la bicapa lipídica que posiblemente disminuye la eficacia de la reacción del acrosoma (Moce *et al.*, 2010)

Gao *et al* (1995) mencionan dos procedimientos importantes relacionados al empleo de ACPs permeables en la criopreservación de células. Primero, la adición de un agente crioprotector a las células antes de la congelación y segundo, la eliminación del agente crioprotector de las células después de la congelación y descongelación. En el primer caso, cuando una célula se coloca en una solución que es hiperosmótica con respecto a los agentes crioprotectores permeables (por ejemplo, el glicerol) pero isotónica con respecto a las sales impermeables, primero se encoge debido al flujo osmótico de agua intracelular y luego aumenta en volumen a medida que el soluto (glicerol) penetra y como agua vuelve a ingresar a la célula. Posteriormente, en el segundo caso para la descongelación, cuando las células con una alta concentración intracelular de crioprotector se exponen a una solución isotónica, como el PBS usado para

realizar lavados por centrifugación; se hincharán debido a una afluencia osmótica de agua extracelular y luego disminuirán en volumen a medida que el glicerol se difunde fuera de las células. Como resultado de estos dos aspectos del procedimiento de criopreservación, las células experimentan estrés osmótico que puede causar una lesión celular "osmótica" significativa.

- **ACPs no penetrantes o de acción extracelular**

Se caracterizan por tener mayor peso molecular por esta razón no logran atravesar la membrana plasmática, pero si la recubren protegiéndola de los cristales de hielo mediante los puentes de hidrógeno formados entre los grupos de los azúcares y los grupos fosfato de los fosfolípidos; además, son eficaces cuando la velocidad de enfriamiento es rápida, estimulando la ósmosis para la pronta deshidratación de la célula, de esta forma se reduce el agua intracelular para evitar su cristalización y formación de hielo (Boiso, 2001; Medeiros *et al.*, 2002). También incrementan la viscosidad de la solución extracelular reduciendo la cristalización fuera de la célula (De Leeuw *et al.*, 1990); estos ACPs son frecuentemente empleados junto a agentes penetrantes y dentro de este grupo destacan los azúcares como la glucosa, lactosa y fructosa; así como las proteínas que se encuentran en la leche y la yema de huevo y entre los menos usados el polivinil-pirrolidona, dextrano y polietilenglicol (Salamon y Maxwell, 1995; Boiso, 2001).

2.7.3. ALTERACIONES DE LOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS

El objetivo de la criopreservación de espermatozoides es conservar la viabilidad y la función de la célula a temperaturas reducidas (Ávila- Portillo *et al.*, 2006); no obstante, se estima que el 40 a 50% de espermatozoides no sobreviven al proceso de criopreservación, incluso con protocolos optimizados (Watson, 2000); asimismo, cuando se compara la subpoblación supuestamente viable después de la

criopreservación, los resultados son generalmente más pobres que con semen fresco (Watson, 2000).

En cuanto a los principales cambios sufridos tras el proceso de criopreservación de espermatozoides, se encuentra la reducción de la motilidad y la integridad de la membrana plasmática. La integridad de la membrana es sustancialmente más resistente al estrés osmótico que la motilidad, esta última se ve afectada por las respuestas de volumen osmótico de las estructuras celulares que están directa o indirectamente involucradas en la motilidad, como podría ser la mitocondria (Gao *et al.*, 1997). Al respecto, se sabe que el PMM se afecta en eventos de estrés osmótico. En ese sentido, cualquier alteración en las mitocondrias podría ocasionar una disminución de la movilidad espermática en dichas condiciones de estrés (Ball y Vo, 2001). En alpacas, se han reportado porcentajes de motilidad inicial que van de 40% a 80% en semen fresco y luego del descongelamiento descienden hasta un 10% a 20%. Sin embargo, en carneros hay una proporción relativamente alta (40-60%) de espermatozoides que preserva su motilidad después de la congelación y descongelación, pero sólo el 20%-30% permanece biológicamente sin daños. Esto indica que un espermatozoide puede ser móvil, pero dañado, en cuyo caso es dudoso que tal célula fertilice el óvulo (Salamon y Maxwell, 2000). Los espermatozoides con anomalías morfológicas y de baja movilidad guardan relación con la síntesis de grandes cantidades de productos tóxicos del metabolismo, principalmente de las especies reactivas del oxígeno (Aitken *et al.*, 1994; Ball y Vo, 2001) formadas a través de la peroxidación de lípidos de las membranas de los espermatozoides; además, dichos eventos se acompañan de una disminución en el transporte y supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino. En ese sentido, la presencia de altos niveles de ROS reduce la fertilidad (Salamon y Maxwell, 2000).

Por otro lado, existe una estrecha relación entre el proceso de criopreservación y la capacitación del espermatozoide; según Watson (2000) los espermatozoides congelados y descongelados se comportan como si estuvieran capacitados, demostrando que estas células luego del descongelamiento muestran tinción positiva con clortetraciclina y un aumento en el Ca^{+2} libre intracelular, típico de los espermatozoides capacitados. Durante el proceso de congelación, las proteínas de la membrana son redistribuidas y excluidas de las regiones de fosfolípidos, ocasionando fallas en la funcionabilidad de los

canales de calcio en la membrana, lo que conlleva a un incremento de la permeabilidad del calcio hacia el medio intracelular; de esta manera se haría posible los fenómenos capacitantes en el espermatozoide, similar al mecanismo observado durante la capacitación y la reacción acrosómica (Rota *et al.*, 2006). Otra semejanza observada en espermatozoides post-descongelados es el patrón de movimiento: menor movimiento lineal y mayor movimiento vigoroso, conocido como “motilidad hiperactivada” en espermatozoides capacitados (Rota *et al.*, 2006). Algunos estudios en ovinos, mencionan que los espermatozoides congelados-descongelados presentan un porcentaje elevado de capacitación (hasta 90%) comparados con semen fresco (entre 5% a 20%) (Maxwell y Watson, 1996), similar a lo reportado en bovinos (Cormier y Bailey, 2003). Lamentablemente, los espermatozoides capacitados tienen una viabilidad reducida y una vida fértil limitada (Maxwell and Watson, 1996), es decir, si los espermatozoides capacitados no se exponen a los ovocitos poco después de la inseminación, no se producirá la fertilización, ya que las células pueden morir prematuramente en la parte inferior del tracto reproductivo, obteniendo resultados desalentadores después de la inseminación cervical con semen congelado (Salamon y Maxwell, 2000).

Por otra parte, la criopreservación aumentaría ligeramente la proporción de espermatozoides viables con reacción del acrosoma (Salamon y Maxwell, 2000). En alpacas, los porcentajes de alteración del acrosoma ocasionados por la congelación-descongelación es inferior al 5% (Morton *et al.*, 2010; Santiani *et al.*, 2005). Semejante a los resultados en ovinos, donde alrededor del 10% de espermatozoides vivos post descongelamiento experimentan reacción acrosomal (Gil *et al.*, 2003).

Otros cambios bioquímicos o pérdidas de contenidos vitales experimentados durante el proceso de criopreservación de espermatozoides, incluyen la liberación de la transaminasa oxaloacética glutámica (GOT), la pérdida de lipoproteínas y aminoácidos, la disminución de la actividad de la fosfatasa, el aumento de sodio y la disminución del contenido de potasio, la inactivación de las enzimas hialuronidasa y acrosina, pérdida de prostaglandinas, reducción de la síntesis de ATP y ADP, disminución de la actividad proteolítica acrosomal (Salamon y Maxwell, 1995). También es posible que ocurra la desnaturalización del ADN, ya que se han observado modificaciones en la estructura de la cromatina de espermatozoides de toro, jabalí, gato, humanos y recientemente en espermatozoides de carnero (Gillan y Maxwell, 1999; Salamon y Maxwell, 2000).

2.7.4. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CSA

Todavía son escasos los estudios relacionados con la criopreservación de espermatozoides de CSA que reportan el uso de agentes crioprotectores del grupo amida como dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF). Tomando en cuenta que las amidas poseen menor peso molecular y mayor capacidad de penetración al aumentar la fluidez de la membrana plasmática evitando la formación de cristales de hielo letales para la supervivencia del espermatozoide, estos ACPs se han empleado en la criopreservación espermática de distintas especies como aves, peces, primates y mamíferos; asimismo, se ha reportado su uso en equinos, Gallo *et al* (2013) trabajaron con concentraciones de 3%, 4% y 5% de DMA en semen equino de la raza Caballo Peruano de Paso y hallaron similares porcentajes de motilidad, viabilidad e integridad funcional de membrana con las tres concentraciones; ofreciendo los 3 grupos buenos resultados. Por su parte, Santiani *et al.* (2016) determinaron que DMA al 3.5% mantuvo una función espermática óptima comparado con dimetilsulfóxido, etilenglicol y glicerol en la criopreservación de semen de Caballo Peruano de Paso.

Uno de los primeros reportes de amidas en la criopreservación de espermatozoides de alpaca fue presentado por Canorio (2008) quien utilizó un dilutor Yolk citrato y obtuvo mejores resultados congelando con DMA a concentración de 0.375M que con DMSO a 0.25M, obteniendo una motilidad post-descongelación de 34% con DMA y 33% con DMSO y porcentajes de integridad de membrana plasmática de 60% y 33% para DMA y DMSO, respectivamente. Asimismo, Canorio *et al* (2015) describen mayores porcentajes de supervivencia espermática (27%) con concentraciones de DMA de 0.2 M a 0.8 M. Por su parte, Rodríguez (2009) congeló espermatozoides de epidídimo de alpaca empleando TES-Tris-yema de huevo con DMA a concentración de 0.375 M y alcanzó una motilidad post-descongelamiento de 14% y un porcentaje de integridad de membrana espermática de 52%, resultados inferiores a los reportados por Canorio (2008).

Por otro lado, los trabajos con Dimetilformamida (DMF) en CSA son aún más escasos. Carretero *et al* (2014) obtuvieron mejores resultados congelando semen de llamas con DMF que con Glicerol, ambas al 7%; obteniendo un porcentaje de motilidad

espermática significativamente mayor (22,1 - 22,5%) con DMF. Al año siguiente, Flores *et al* (2015) evaluaron el efecto de DMF (al 4 y 7 %) en la movilidad de espermatozoides criopreservados de alpacas a través del sistema ISAS y obtuvieron bajos valores de movilidad total de 8,0 - 10,4%.

Debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en estudios sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca, es necesario evaluar y comparar ACPs permeables del grupo amida como DMA y DMF; pero tomando en cuenta el efecto tóxico de las amidas asociado con su concentración, es necesario evaluarlas a concentraciones distintas pero sometidos bajo los mismos parámetros utilizando técnicas de evaluación modernas y de mayor precisión como citometría de flujo por imágenes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN

Las muestras se obtuvieron del camal municipal de Huancavelica y su desarrollo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de mayo a agosto del 2018.

3.2. MUESTRA DE ESTUDIO

La fórmula utilizada para calcular el tamaño muestral se presenta a continuación:

$$n = \frac{2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Donde:

n = tamaño muestral

Z_{α} = Valor Z que corresponde al riesgo deseado

Z_{β} = Valor Z que corresponde al poder deseado asociado al riesgo escogido

S^2 = Varianza

d = Valor mínimo de la diferencia a detectar

$$n = \frac{2(1.960 + 0.842)^2 * 8^2}{5^2} = 40$$

El cálculo del tamaño muestral resultó de 40 para este experimento. De cada cola del epidídimo se recuperaron espermatozoides que fueron separados en 6 alícuotas (2 tipos de crioprotectores a 3 concentraciones), dando un total de 240 repeticiones. Se trabajaron con 40 testículos con un peso ≥ 10 g, longitud testicular ≥ 3 cm, concentración espermática $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides/mL y motilidad ≥ 30 %.

3.3. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Después del beneficio del animal, se realizó una incisión pre escrotal, se divulsionó y se expuso el testículo de un lado con la túnica vaginal intacta, luego se realizó un corte con una tijera mayo recta a nivel del cordón espermático a unos 3 cm del testículo; una vez recuperados ambos testículos, fueron lavados con solución fisiológica (NaCl 0.9 %) y colocados en bolsas herméticas individuales nuevamente con NaCl 0.9 %. Fueron almacenados en cajas de transporte con refrigerantes a una temperatura de 5°C y trasladados a Lima para su evaluación. El tiempo transcurrido desde la obtención de los testículos en el camal hasta su recepción en el laboratorio para su respectivo procesamiento fue de 20 horas.

3.4. DILUTOR Y CRIOPROTECTORES

Se usó el dilutor en base a leche descremada – yema de huevo – fructosa descrito por Santiani *et al.* (2005). Para preparar el dilutor se procedió a realizar una mezcla de 19 mL de leche descremada UHT (Gloria S.A.), 1 mL de yema de huevo fresco y 0.970 g de D-(-) fructosa 99% (K38435307840 – Merck). Además los ACPs utilizados fueron: dimetilacetamida (D137510- Sigma) y dimetilformamida (D4551- Sigma).

3.5. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO

En el laboratorio se prepararon los materiales una hora antes de la llegada de los testículos, para lo cual se colocaron placas Petri de plástico medianas y pequeñas, láminas porta objeto, laminas cubre objeto y tubos Eppendorf de 1.5 mL en la estufa precalentada a 37.5°C. Luego en una bandeja plástica se colocó papel absorbente, recipiente pequeño de plástico, un mango de bisturí con un bisturí, una pinza plana y una tijera Mayo recta. Inmediatamente, luego de la llegada de los testículos, se procedió con el retiro de la túnica vaginal parietal de cada testículo, se divulsionó para separar el epidídimo y se aisló la cola del epidídimo mediante un corte con la tijera Mayo recta y la pinza plana, se retiró todo el tejido conectivo visible con el mismo instrumental y con el bisel no cortante de una hoja de bisturí se eliminó el contenido de los vasos sanguíneos para reducir la contaminación de la muestra. Después se realizó un lavado con PBS temperado (37.5 °C) a la cola del epidídimo para luego colocarla en una placa Petri previamente temperada a 37.5 °C; ya en la placa se le agregó 1.5 mL del dilutor a base de leche descremada, yema de huevo y fructosa descrito por Santiani *et al.* (2005) temperado a 37.5 °C. Se realizaron cortes seriados con una hoja de bisturí para la liberación de los espermatozoides epididimarios. Una vez terminada la liberación, se colectó la suspensión en un tubo Falcon de 15 mL y se utilizó 10 µL de la muestra para la evaluación de la motilidad espermática y 10 µL para evaluar la concentración. Luego

de ello, se añadió 1 mL del dilutor a la muestra, obteniéndose un total de 2.5 mL de muestra diluida los que fueron distribuidos en 6 alícuotas de 300 µL cada una.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño factorial de dos por tres (dos crioprotectores × tres concentraciones) (Cuadro 1). Se obtuvieron 240 repeticiones (40 repeticiones por tratamiento) procedentes de 40 epidídimos. Los espermatozoides recuperados de cada epidídimo se dividieron en 6 alícuotas de 300 µL para cada uno de los tratamientos: DMA 1%, DMA 3.5%, DMA 7%, DMF 1%, DMF 3.5%, DMF 7%. Se adicionaron en cada Eppendorf 3 µl, 10.5 µl y 21 µl de DMA y DMF para llegar a una concentración final de 1%, 3.5% y 7%, respectivamente. Previamente, se retiró la misma cantidad de muestra diluida que fue reemplazada por la cantidad en µL de los agentes crioprotectores. Luego se procedió a llenar las pajillas plásticas de 0.25 mL con cada tratamiento para su posterior congelación.

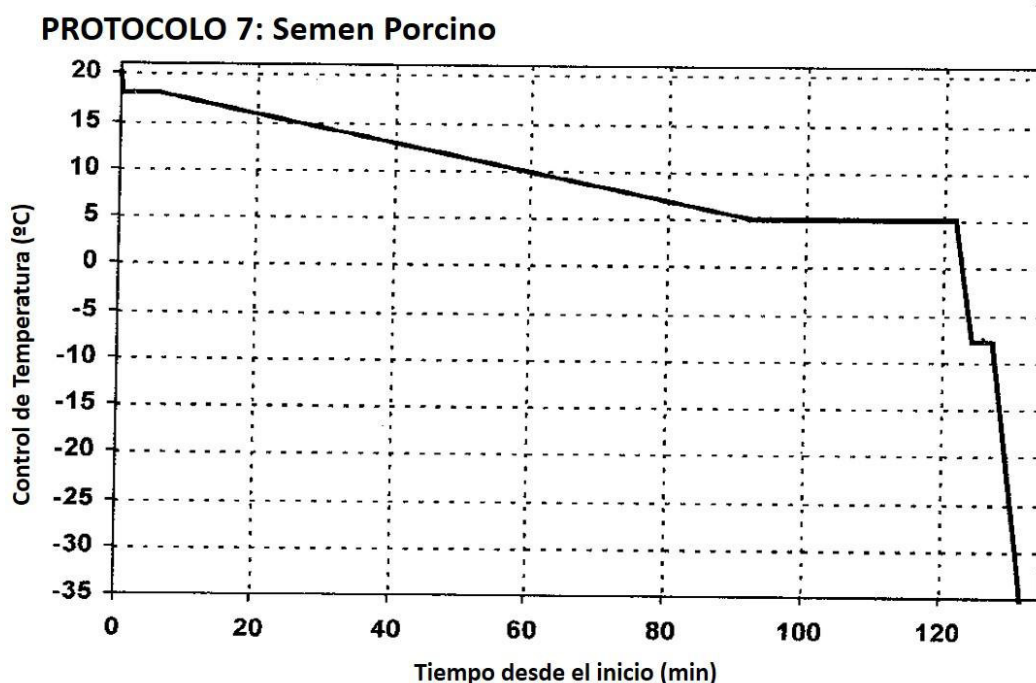
Fig. 2 Diseño factorial de dos por tres para evaluar el efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en concentraciones de 1%, 3.5% y 7% en espermatozoides epididimarios de alpaca

concentraciones	tipos de crioprotectores	
	DMA	DMF
1%	DMA 1%	DMF 1%
3.5%	DMA 3.5%	DMF 3.5%
7%	DMA 7%	DMF 7%

3.7. CRIOPRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO

Para la criopreservación se utilizó un sistema automático de congelamiento Cryobath (Cryologic), utilizando el programa # 7. Se colocaron las pajillas en el Cryobath, en este programa las muestras iniciaron con una temperatura de 18 °C bajando hasta 5 °C en un lapso de 90 min luego hicieron una meseta a 5 °C por 30 min para finalmente seguir su descenso de temperatura hasta congelarse. Una vez congeladas las pajillas se retiraron y fueron almacenadas en el tanque de nitrógeno líquido a -196 °C.

Fig. 3 Esquema de la curva de enfriamiento del programa 7 utilizado para semen de alpaca en este estudio



3.8. DESCONGELAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Inmediatamente después de extraer las pajillas del tanque de nitrógeno líquido, se sumergieron en baño maría a 37°C por 1 minuto (Morton *et al.*, 2007); pasado el minuto el contenido de cada pajilla de 0.25 mL fue vertido en tubos Eppendorf templados a 37°C, rápidamente se procedió a evaluar las características espermáticas de la siguiente manera:

- a. **Motilidad:** Se colocó 10 µL de la muestra en una lámina portaobjeto templada a 37°C, luego se le colocó el cubreobjetos y se evaluó la motilidad progresiva de los espermatozoides epididimarios a 40 x, sobre el total de espermatozoides.
- b. **Lavados:** A continuación, se procedió a realizar dos lavados de cada muestra con solución PBS, para ello se añadió 1 mL de PBS templado a 37.5°C a cada tubo Eppendorf con muestra, se homogenizó y se centrifugó a 600 g por 8 min. Una vez finalizado el proceso se retiró el sobrenadante y se quedó sólo con el pellet al que se le añadió 1 mL de PBS templado a 37.5 °C para un segundo lavado, nuevamente se homogenizó y se centrifugó a 600 g por 8 min y se retiró el sobrenadante, el pellet fue resuspendido y homogenizado con 100 µL de PBS templado a 37.5 °C.
- c. **Viabilidad e integridad de la membrana plasmática:** Para la evaluación de la viabilidad espermática se utilizó el kit Sperm Viability (D3861- Molecular Probes, Eugene, OR, USA) que consta de 2 componentes, Componente A (SYBR-14) y Componente B (PI). La solución stock del SYBR-14 se diluyó 1:50 en DMSO. Para tal efecto se tomó 100 µL del componente A y se diluyó en 4900 µL de DMSO. Luego se procedió a alicuotar la solución Stock SYBR-14 (20 µM). Se prepararon 100 alícuotas de 50 µL cada una y se congelaron a -20°C protegidos de la luz. Para la solución stock de PI, se prepararon 250

alícuotas de 20 μ L cada una con el componente B y se congelaron a -20°C protegidos de la luz (Concentración final PI 2.4 mM).

d. Potencial de membrana mitocondrial (PMM): PMM fue evaluado por Mitotracker Deep Red FM (M22426- Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Para la solución stock se diluyó 50 μ g de Mitotracker Deep Red FM en 92 μ L de DMSO para llegar a una concentración final de 1mM. Se homogenizaron y se prepararon alícuotas de 2 μ L y se guardaron en congelación a -20°C protegidos de la luz. Para la solución de trabajo, se retiró del congelador la alicuota y se diluyó 2 μ L de solución stock Mitotracker Deep Red FM (1mM) en 100 μ L de PBS para llegar a una concentración final de 20 μ M.

e. Adición de soluciones stock: Luego de realizarse los 2 lavados, se le agregó al pellet resuspendido con 100 μ L de PBS, las siguientes soluciones:

- 0.5 μ L de Solución Stock de SYBR-14 (20 μ M) para obtener una concentración final de 100 nM de SYBR-14.
- 0.5 μ L de Mitotracker Deep Red FM (20 μ M) para llegar a una concentración final de 100 nM.
- 0.5 μ L de solución Stock de PI (2.4 mM) para llegar a una concentración final de PI de 12 μ M.

Y se llevó a incubar durante 10 minutos en oscuridad a 37.5°C para su posterior análisis.

3.9. CITOMETRÍA DE FLUJO

Las muestras fueron evaluadas utilizando un citómetro de flujo con analizador de imágenes FlowSight (Amnis, Seattle, WA, USA). Las adquisiciones se obtuvieron utilizando el programa INSPIRE Version 100.3.218.0 (Amnis, Seattle, WA, USA). Los espermatozoides fueron identificados en base a gráficos de Dotplot de campo claro versus relación de aspecto, y verificados por una galería de imágenes. SYBR-14 y PI fueron excitados por un láser de longitud de onda de 488 nm y la fluorescencia emitida por SYBR-14 fue detectada en el canal 2 (Ch02: 505-560 nm), mientras que la

fluorescencia de PI fue detectada en el canal 5 (Ch05: 642-740 nm). MitoTracker Deep Red FM fue excitado por un láser de longitud de onda de 642 nm y la fluorescencia emitida fue detectada en el canal 11 (Ch11: 642-740 nm). Para cada muestra, se adquirieron 10,000 eventos. Se utilizó el software de análisis de datos IDEAS versión 6.2 (Amnis, Seattle, WA, USA). Se utilizaron diagramas de dispersión para el análisis de SYBR-14 y PI, mientras que los histogramas se usaron para analizar la fluorescencia del Mitotracker Deep Red FM (Figura 6y 7). Se consideraron espermatozoides viables con membrana plasmática intacta a los que presentaron intensidad de fluorescencia verde marcado por el SYBR-14 y espermatozoides no viables (muertos) con membrana plasmática dañada a los que presentaron intensidad de fluorescencia roja marcado por el PI (Figura 5). Asimismo, se consideraron espermatozoides vivos con alto PMM a los que mostraron fluorescencia roja en la pieza media (Figura 4).

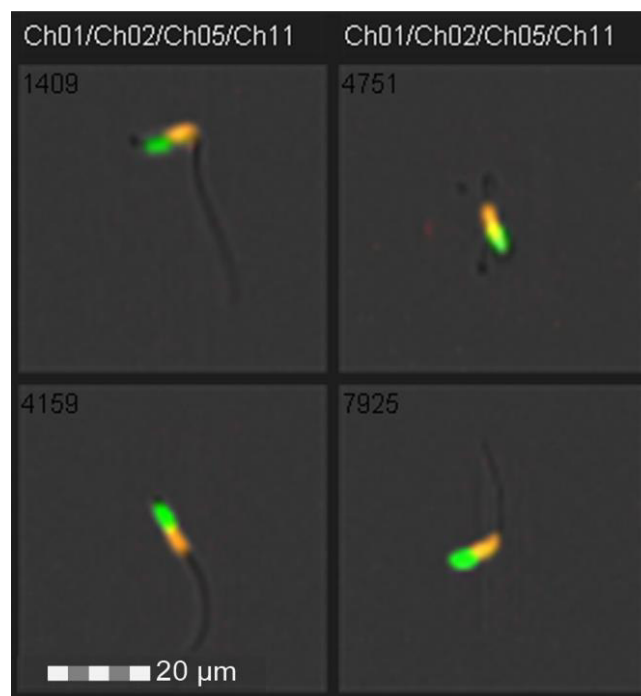


Fig. 4: Patrones de espermatozoides epididimarios de alpaca con SYBR-14/PI evaluados en los canales 2 y 5, respectivamente: las imágenes muestran espermatozoides viables con alto PMM evaluados por citometría de flujo

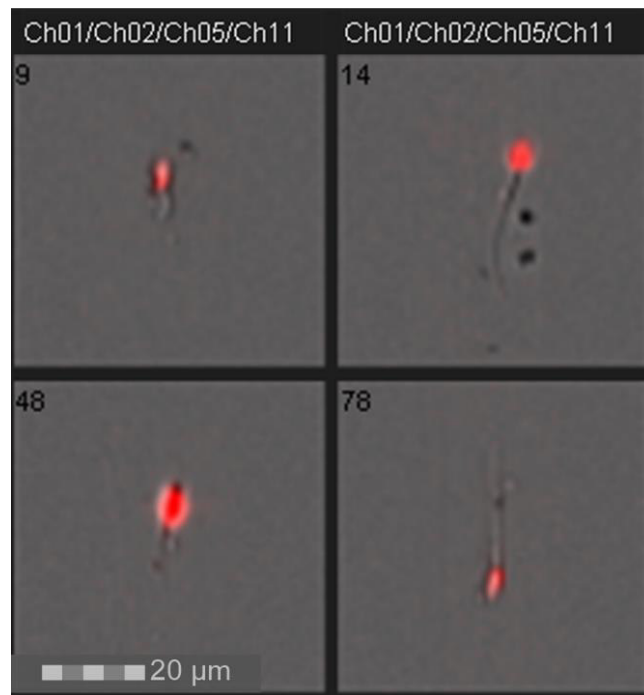


Fig. 5: Patrones de espermatozoides epididimarios de alpaca con MitoTracker Deep Red FM evaluados en el canal 11, respectivamente: las imágenes muestran espermatozoides muertos con bajo PMM evaluados por citometría de flujo

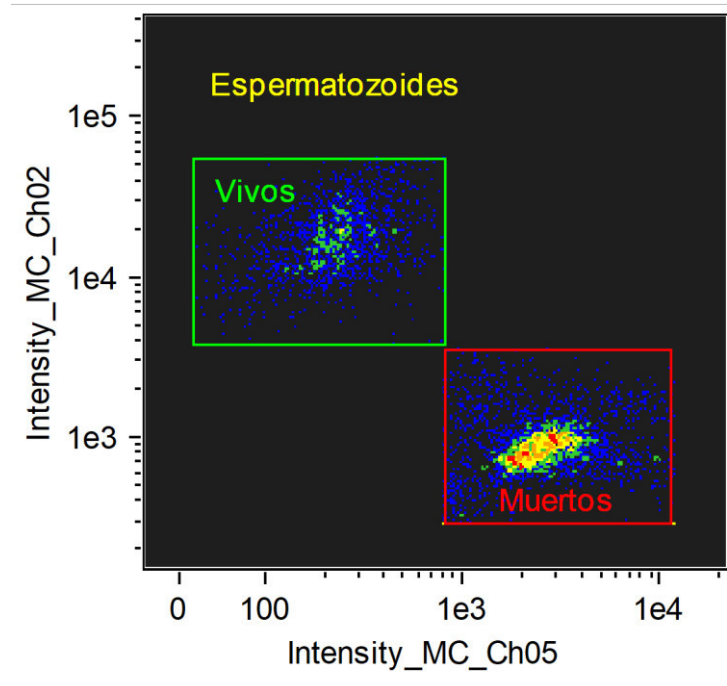


Fig. 6: Análisis de viabilidad espermática mediante diagrama de dispersión DOT-PLOT de espermatozoides epididimarios de alpaca con SYBR14 y PI, espermatozoides viables en el cuadrante superior izquierdo y espermatozoides muertos en el cuadrante inferior derecho.

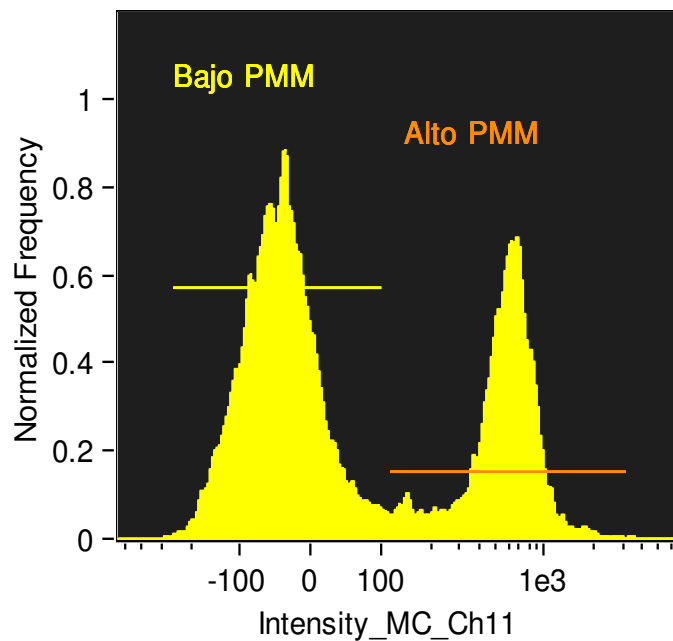


Fig. 7: Análisis de potencial de membrana mitocondrial (PMM) mediante histograma de espermatozoides epididimarios de alpaca con Mitotracker Deep Red FM, alto PMM hacia la derecha y bajo PMM hacia la izquierda

3.10. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Las variables motilidad, viabilidad espermática y la actividad mitocondrial fueron transformadas a valores angulares para acercar los datos a la distribución normal.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los porcentajes de motilidad, viabilidad espermática y actividad mitocondrial, se utilizó un análisis de varianza para el diseño factorial 2 x 3 (dos crioprotectores \times tres concentraciones) considerando como factores independientes el crioprotector, la concentración y la interacción crioprotector-concentración. Asimismo, para determinar diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey. Para todos los análisis un nivel de significancia de 5% fue considerado significativo. En el análisis estadístico se empleó el paquete estadístico SPSS Statistic v. 22.0.

IV. RESULTADOS

En el cuadro 1 se observan los porcentajes de motilidad post descongelamiento en espermatozoides de alpaca utilizando dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en 3 concentraciones distintas. En relación con la motilidad post descongelamiento, se encontró efecto significativo del tipo de crioprotector empleado ($p=0.001$) y de la concentración a la que fue empleado ($p<0.001$). Con respecto al crioprotector utilizado, se encontró que DMA tuvo un mejor efecto en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca que DMF (14% versus 10%). En relación a la concentración del crioprotector, los espermatozoides congelados con crioprotectores al 1% y 3.5% obtuvieron mejores porcentajes de motilidad post descongelamiento (14% y 15%, respectivamente) en comparación con los espermatozoides congelados con crioprotectores al 7% (7%). Por otro lado, se encontró que no existe efecto significativo de la interacción crioprotector-concentración ($p=0.619$).

Cuadro 1: Efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%) sobre la motilidad post descongelamiento en espermatozoides epididimarios de alpacas¹

	DMA	DMF	Promedio
1%	17.45% ± 5.60% ^{ya}	10.19% ± 4.10% ^{za}	13.82% ± 3.55% ^a
3.5%	16.00% ± 5.50% ^a	14.17% ± 6.46% ^a	15.08% ± 4.22% ^a
7%	8.60% ± 5.79% ^{yb}	4.58% ± 4.61% ^{zb}	6.59% ± 3.70% ^b
Promedio	14.02% ± 3.31% ^y	9.64% ± 3.05% ^z	

¹ Los datos son presentados como promedios ± intervalo de confianza

^{a,b} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencia significativa

^{y,z} Letras diferentes dentro de una fila indican diferencia significativa

En el cuadro 2 se observan los porcentajes de viabilidad espermática post descongelamiento en espermatozoides de alpaca utilizando DMA y DMF en 3 concentraciones distintas. Con respecto a la viabilidad espermática, se encontró efecto significativo de la concentración del crioprotector ($p < 0.001$) existiendo diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones empleadas. Encontrándose que la concentración al 1% tuvo una mayor viabilidad espermática post descongelamiento (19%) que la concentración de 3.5% (16%), que a su vez fue mayor que la concentración al 7% (14%). En relación al crioprotector empleado, no se encontró diferencia estadística significativa entre los crioprotectores ($p = 0.323$). Así tampoco existe efecto significativo de la interacción crioprotector-concentración ($p = 0.347$).

Cuadro 2: Efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%) sobre la viabilidad espermática en espermatozoides epididimarios de alpacas¹

	DMA	DMF	Promedio
1%	18.65% ± 3.41% ^a	18.55% ± 3.31% ^a	18.60% ± 2.36% ^a
3.5%	15.49% ± 3.29% ^b	17.29% ± 3.48% ^{ab}	16.39% ± 2.39% ^b
7%	13.54% ± 3.36% ^b	14.23% ± 3.76% ^b	13.88% ± 2.50% ^c
Promedio	15.86% ± 1.96%	16.70% ± 2.04%	

¹ Los datos son presentados como promedios ± intervalo de confianza

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencia significativa

En el cuadro 3 se observan los porcentajes de potencial de membrana mitocondrial (PMM) post descongelamiento en espermatozoides de alpaca utilizando DMA y DMF en 3 concentraciones distintas. Con respecto al PMM, existe efecto significativo de la concentración del crioprotector ($p < 0.001$), encontrándose que los espermatozoides congelados con crioprotectores al 1% y 3.5% obtuvieron mejores porcentajes de PMM post descongelamiento (19% y 17%, respectivamente) en comparación con los espermatozoides congelados con crioprotectores al 7% (14%). En relación al crioprotector utilizado, no se encontró diferencia estadística significativa entre los crioprotectores ($p = 0.247$). Asimismo no existe efecto significativo de la interacción crioprotector-concentración ($p = 0.355$).

Cuadro 3: Efecto de dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%) sobre el potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides epididimarios de alpacas¹

	DMA	DMF	Promedio
1%	19.36% ± 3.46% ^a	19.04% ± 3.27% ^a	19.20% ± 2.36% ^a
3.5%	16.55% ± 3.29% ^{ab}	17.94% ± 3.62% ^{ab}	17.24% ± 2.43% ^a
7%	13.04% ± 3.11% ^b	14.81% ± 3.60% ^b	13.91% ± 2.37% ^b
Promedio	16.28% ± 1.94%	17.27% ± 2.03%	

¹ Los datos son presentados como promedios ± intervalo de confianza

^{a,b} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencia significativa

V. DISCUSIÓN

Este estudio es el primer reporte que compara el efecto de dos tipos de amidas (DMA y DMF) en distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%) para la criopreservación de espermatozoides de alpaca. Previo a este estudio, han habido escasos reportes de amidas como agentes crioprotectores alternativos para esta especie, siendo más reciente el reporte de Canorio *et al.* (2015) quienes compararon DMA al 1.7%, 3.5% y 7%. Asimismo, Flores *et al.* (2015) utilizaron DMF como agente crioprotector en concentraciones de 4% y 7%. De manera similar se han venido realizando experimentos en otras especies, como el descrito por Rakha *et al.* (2017) quienes compararon DMA al 4%, 6%, 8% y 10% en la criopreservación de semen de gallo (*Gallus gallus murghi*) obteniendo los mejores resultados con concentraciones al 6%.

Entre los grupos amida, el presente estudio determinó que DMA tuvo un mejor efecto en la criopreservación de espermatozoides de alpaca que DMF, respecto al porcentaje de motilidad post descongelamiento. Resultado similar al estudio realizado por Santiani *et al.* (2016), quienes señalan que DMA muestra mejores resultados de motilidad post descongelamiento en comparación con otros agentes crioprotectores evaluados en dicho estudio para la criopreservación de espermatozoides del caballo Peruano de Paso. De igual manera, en un estudio reciente Seifi-Jamadi *et al.* (2017) indicaron que DMA es más eficaz como agente crioprotector para la congelación de espermatozoides de cabra, siendo una alternativa al glicerol. Lo mencionado anteriormente podría explicarse porque DMA tiene la capacidad de penetración al aumentar la fluidez de la membrana plasmática a través del reordenamiento de lípidos y proteínas que causan disminución en la formación de hielo a bajas temperaturas (Holt, 2000; Blanco *et al.*, 2011).

Por otro lado, en nuestro estudio no hubo diferencia significativa entre los crioprotectores (DMA y DMF), respecto a la viabilidad espermática y el potencial de membrana mitocondrial. Ambos parámetros evaluados en este estudio mediante citometría de flujo por imágenes son novedosos en estudios de criopreservación de espermatozoides, por lo que aún no se cuentan con reportes similares para tal comparación.

A su vez, las amidas poseen la desventaja de su efecto tóxico asociado con su concentración (Blanco *et al.*, 2000), es por ello que por primera vez en este estudio se determinó que las concentraciones de 1% y 3.5% permiten obtener mejores rangos de motilidad post descongelamiento, viabilidad espermática y potencial de membrana mitocondrial que la concentración de 7%, en la criopreservación de espermatozoides de alpaca, independientemente del tipo de crioprotector. Resultados similares se han observado en otras especies, como el cerdo y el ratón, los cuales no toleran concentraciones superiores al 3% y 1.75%, respectivamente, utilizando glicerol como agente crioprotector. Además, los reportes de uso de amidas en alpacas emplean DMA al 3.5% obteniendo resultados similares (9% - 33%) al presente estudio, respecto a motilidad post descongelamiento (Mancisidor, 2013; Banda, 2010; Rodríguez, 2009; Canorio, 2008). Sin embargo, en un estudio anterior Canorio *et al.* (2015) señalan mejores resultados de motilidad post descongelamiento, viabilidad e integridad de la membrana plasmática con concentraciones de 3.5% y 7% que al 1.7% utilizando DMA como agente crioprotector para la congelación de espermatozoides de alpaca; los autores obtuvieron luego del descongelamiento porcentajes de motilidad de 34% con DMA al 3.5% y 29% con DMA al 7%; viabilidad de 61% con DMA al 3.5% y 46% con DMA al 7%; asimismo, sus resultados para integridad de la membrana plasmática fueron de 64% con DMA al 3.5% y 53% con DMA al 7%; mientras que con DMA al 1.7% sólo obtuvieron 27% de motilidad, 41% de viabilidad y 45% de integridad de membrana plasmática, encontrando diferencia significativa entre los dos primeras concentraciones y esta última. Por su lado, Flores *et al.* (2015) no obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones de 4% y 7% de DMF respecto a la motilidad post descongelamiento, obteniendo 10% con DMF al 4% y 8% con DMF al 7%. Los diferentes resultados observados entre este y los estudios anteriormente mencionados podrían deberse a las diferentes metodologías utilizadas para la evaluación espermática, como los parámetros evaluados en este estudio mediante citometría de

flujo (Fluorocromo SYBR-14/PI para viabilidad e integridad de la membrana y el fluorocromo MitoTracker Deep Red FM para PMM) o el sistema de análisis ISAS utilizado por Flores *et al.* (2015), ambos resultan ser más objetivos que el método convencional empleado por Canorio *et al.* 2015 (Colorante eosina para determinar la viabilidad y el test hipoosmótico para determinar la integridad de la membrana plasmática). Asimismo, se debe considerar los diferentes diluyentes utilizados en cada estudio (Leche descremada-fructosa-yema de huevo versus Tris-fructosa-yema de huevo y Tes-Tris-Yolk, respectivamente) pero sobre todo debe tenerse en cuenta la intensidad de los cambios inducidos por la criopreservación la cual es altamente específica de la especie (Blanco *et al.*, 2011; Roushdy *et al.*, 2014; Massip *et al.*, 2004).

Finalmente, se determinó que no existe efecto significativo de la interacción crioprotector-concentración en ninguno de los parámetros evaluados. Es decir, el efecto del tipo de crioprotector (DMA y DMF) no cambia según las distintas concentraciones (1%, 3.5% y 7%).

El presente estudio utiliza espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo por ser un modelo práctico y más sencillo de trabajar dentro del laboratorio, además esta muestra carece del viscoso plasma seminal que dificulta su manipulación para el proceso de criopreservación. Inicialmente este modelo fue presentado en espermatozoides de alpaca por Morton *et al.* 2007, y posteriormente fue reproducido para realizar trabajos de investigación en la misma especie (Canorio, 2008; Rodríguez, 2009; Terreros, 2011; Choez, 2016) dando resultados favorables, como en este estudio.

El dilutor utilizado en nuestro estudio está compuesto principalmente por leche descremada, fructosa y yema de huevo, el cual fue descrito por Santiani *et al.* (2005) quienes reportaron mejores valores de motilidad en comparación con un dilutor en base a Tris. Esto podría deberse a la caseína, presente en la leche, la cual tiene un efecto antioxidante que ofrece protección a los espermatozoides mientras la temperatura va disminuyendo (Salamon y Maxwell, 2000). Además, en la yema de huevo se encuentran las lipoproteínas de baja densidad (Moussa *et al.*, 2002), que evitan el “choque de frío” y mantienen la integridad de la membrana (Watson, 1981). De esa manera, el dilutor Leche descremada-fructosa-yema de huevo favorece la conservación espermática en alpacas y llamas (Banda *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2015; Choez, 2016) por lo que resultó útil para el presente estudio.

VI. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se puede concluir que dimetilacetamida tuvo un mejor efecto que dimetilformamida en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca, respecto a la motilidad post descongelamiento; sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa en relación a la viabilidad espermática y el potencial de membrana mitocondrial.
- Independientemente del tipo de crioprotector, dimetilacetamida o dimetilformamida; las concentraciones de 1% y 3.5% conservaron mejor las características espermáticas de motilidad, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial que concentraciones de 7% en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

VII. ANEXOS

Fig 1. Evaluación del peso y tamaño de las muestras recepcionadas



Fig. 2 Disección de la cola del epidídimo para la recuperación de los espermatozoides



Fig. 3 Criopreservación de las muestras mediante un sistema automático de congelamiento Cryobath (Cryologic)



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abecia A, Forcada F. 2010. Manejo reproductivo en ganado ovino. 1ª ed. Zaragoza: Servet. p 90-130
2. Abraham M, Puhakka J, Ruete A, Al-Essawe E, de Verdier K, Morrell J, Båge R. 2016. Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Vet Scand* 58:10.
3. Adams G, Ratto M. 2001. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Rev Inv Vet Perú* 1:134-141.
4. Aitken R, Fisher H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16:259-267.
5. Aitken R, Paterson M, Fisher H, Buckingham D, Van-Duin M. 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 108:2017-2025.
6. Alarcón V, García W, Bravo W. 2012. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú* 23:58-64.
7. Aller J. 2001. Cryopreservation of semen and artificial insemination in South American camelids. International Foundation for Sciences Final Report.
8. Aller J, Rebuffi G, Cancino A, Alberio R. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archiv Zootec* 152:15-23
9. Almilid T, Johnson L. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim* 66: 2899-905.
10. Amann R, Pickett B. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci* 7:145-176.
11. Amaral A, Ramalho-Santos J. 2010. Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl* 33:180-186.
12. Anel L, Gerra C, Alvarez M, Anel E, Martinez AF, Boixo CJ, Kaabi M, Herraiz P, Paz P. 2002. Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Therio* 57:577.

13. Ávila-Portillo L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C, Delgado L, Gómez C, Lozano J, Reguero M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 57:291-300.
14. Ax R, Dally M, Didion B, Lenz R, Love C, Varner D, Háfes B, Bellin M. 2000. Semen evaluation. En: Hafez, E.S.E. and Háfes B (eds), *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 365-375.
15. Ball B, Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potencial. *J Androl* 22:1061-1069.
16. Ballou JD. 1992. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* 29: 19-25.
17. Bamba K, Adams CE. 1990. Freezing rabbit semen by use of BF5 diluent. *Lab Anim* 24:172-175.
18. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. 2010. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 21: 145-153.
19. Barrios A. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. En: XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera, Venezuela. p 1-14.
20. Blanco J, Gee G, Wildt D, Donoghue A. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod* 63: 1164-1171.
21. Blanco J, Long J, Gee G, Wildt D, Donoghue A. 2011. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 123:242-248.
22. Boerke A, Tsai P, García-Gil N, Brewis I, Gadella B. 2008. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosoma reaction. *Therio* 70: 1188-96.

23. Boiso I. 2001. Principios de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad 18(4).
24. Boyer P. 2001. Toward an adequate scheme for the ATP synthase catalysis. Biochem 8: 246–247.
25. Bravo W, Johnson L. 1994. Reproductive physiology of the male camelid. En: Johnson LW (ed) Actualización sobre medicina de llama. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice WB Saunders. Filadelfia, 10:259-264.
26. Bravo W. 1995. Reproductive biology of the male South American camelid: A review. J Androl 7:3-4
27. Bravo W, Flores D, Ordóñez C. 1997. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. Biol Reprod 57:520-524.
28. Bravo W, Skidmore J, Zhao X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Anim Reprod Sci 62:173-193.
29. Bravo W. 2002. The reproductive process of south american camelids. Seagull Printing, Salt Lake City, Utah, USA.
30. Brockbank M, Covault J, Taylor J. 2007. Criopreservation guide. Thermo Scientific. 24 p.
31. Bucak M, Sariozkan S, Tuncer P, Sakin F, Atessahin A. 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Ruminant Res 89:24-30
32. Buendía P, Soler C, Paolicchi F, Gago G, Urquieta B, Pérez-Sánchez F, Bustos-Obrigón E. 2002. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer computer-assited system. Therio 57:1207-1218.
33. Busch W, Waberski D. Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. 1ª ed. Zaragoza: Acribia. p 19, 117-133
34. Callo M, Garnica J, Bravo W. 1999. Efecto de la fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina sobre la viscosidad del semen en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco, Perú.
35. Canorio N. 2008. Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Magister en Biología Molecular. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 102p.

36. Canorio N, Paredes F, Valdivia M. 2015. Agentes crioprotectores Alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). Rev Inv Vet Perú 26:434-443.
37. Cárdenas N. 2002. Inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas. Tesis de médico veterinario y zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano.
38. Carretero MI, Santa Cruz R, Neild D, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. 2014. Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen en llama (*Lama glama*). Spermova 3:174-176.
39. Celeghini E, Nascimiento J, Raphael C, Andrade A, Arruda R. 2010. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. Arq Bras Med Vet Zootec. 2:536-543
40. Chang MC. 1984. The meaning of sperm capacitation. J Androl 5: 45-50.
41. Cheuquemán C, Bravo P, Treulén F, Giojalas L, Villegas J, Sánchez R, Risopatrón, J. 2012. Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. Reprod Domest Anim 47(1):39-43.
42. Choez K. 2016. Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Tesis de Magister en Ciencia Animal. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 102 p.
43. Cooper TG. 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. J Reprod Fertil Suppl 53: 119-136.
44. Cormier N, Bailey J. 2003. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. Biol Reprod 69(1):177-85.
45. Critser J, Arneson B, Aaker D, Huse-Benda A, Ball G. 1988. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. J Reprod Fertil 82:27-33.
46. Critser J, Noiles E. 1993. Bioassay of sperm function. Reprod Endocr 11:1-16.
47. Dávalos R, Olazabal J, Echevarria L. 1999. Avances en la evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Resúmenes II congreso Mundial sobre Camélidos, Cusco. 74 p.
48. De Lamirande E, Gagnon C. 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. Free Radl Biol Med 14:157-166.

49. De Leeuw F, Colenbrander B, Verkleij A. 1990. The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl* 1:95-104.
50. Drobnis E, Crowe L, Berger T, Anchordoguy T, Overstreet J, Crowe J. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265:432-437.
51. England G, Allen W. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. Effects of seminal plasma and blood. *Therio* 37: 373-381.
52. Evangelista-Vargas D, Evangelista-Vargas S, Santiani A, Valdivia M. 2015. Análisis morfométrico de espermatozoides de alpaca utilizando software de captura y medición de imágenes. En: I congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. Buenos aires, Argentina. p 395-398.
53. Feradis A, Pawitri , Suatha L, Amin M, Yusuf T, Sajuthi D, Budiarsa L, Hayes E. 2001. Cryopreservation of epididimal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol* 30:100-106.
54. Fernández-Baca S. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú (Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). [Internet], [24 abril 2018]. Disponible en: http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf
55. Fernández-Baca S, Novoa C. 1968. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). *Rev Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos* 22:19-35.
56. Ferramosca A, Zara V. 2014. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int* 902953.
57. Ferré L, Malick de Tchara G, Aller J, Alberio R. 2000. Effect of diluent, seminal plasma and centrifugation on quality traits of llama semen. En: Resúmenes del XIV Congreso Internacional de Reproducción Animal. Tomo II, 36 p.
58. Flesh F, Gadella M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process fertilization. *Biochim Biophys. Acta*: 1469:197-235.
59. Flores NH, Cucho H, Carretero MI, Ciprián R, Quispe H, Calderón N, Miragaya M, Giuliano S. 2015. Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de

- espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS. *Spermova* 5:47-50.
60. Fowler M. 1989. *Medicine and Surgery of South American Camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco*. 2ª ed. Iowa: Iowa State University Press. 549 p.
 61. Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa O. 2005. First Messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl ciclase/cAMP. *J Reprod Dev* 51:37- 46.
 62. Gallo S, Vargas S, Orozco V, Evangelista S, Santiani A. 2013. Criopreservación de semen de caballo peruano de paso utilizando dimetilacetamida como agente crioprotector. *Spermova* 3(1):71-72.
 63. Gao D, Liu J, Liu C, McGann L, Watson P, Kleinhans F, Mazur P, Critser E, Critser J. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod* 10:1109-1122.
 64. Gao D, Mazur P, Critser JK. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Critser JK, ed. *Reprod Tissue Banding: Scientific Principles*. California Academic Press, p 263–328.
 65. García J, Vila L. 1984. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clín Hematol* 6:219-225.
 66. Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32:85-90.
 67. Garnica J, flores E, Bravo W. 1995. Citric acid and fructose concentration in seminal plasma of the alpaca. *Small Ruminant Res* 18:95-98.
 68. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Therio* 59:1241-1255.
 69. Gillan L, Maxwell WMC. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil Suppl* 54:271–283.
 70. Giuliano S, Spirito S, Miragaya M, Capdevielle E, Agüero A, Boquet M, Ferrari M. 2002. Electroejaculation and seminal parameters in vicuña (*Vicugna vicugna*). *Therio* 57: 583.
 71. Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 104:359-369.

72. Giuliano S, Chaves M, Trasonas V, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya M. 2012. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Anim Reprod Sci* 131:204-210.
73. Gómez A, Casas M. 2014. Interpretación clínica del laboratorio. 8ª ed. Bogotá: Médica Internacional. p 139-140
74. Gonzales V, Copa S, Ochoa R. 2003. Efecto de la bulbouretrectomía y la periodicidad de colección en las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado en llamas de tres edades. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Potosí. Tomo II:743-746
75. Guerrero A. 2006. Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa. Tesis Doctoral. Louisiana: Louisiana State University.
76. Hafez E. 2002. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez E. S. E., Hafez B., eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. 441-452 p.
77. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Therio* 63:2311-2322.
78. Hanzen C, Cucho H, Ampuero E, Ordóñez C, Sumar J. 2014. Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos. 1ª ed. Cusco. 80 p.
79. Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38
80. Harrison R, Gadella B. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Therio* 63(2):342-351.
81. Haugland R. 2002. Probes fo organelles. En: Handbook of Fluoresecent Probes and Research Products, Molecular Probes. Oregon, p 473-488.
82. Hay M, King W, Gartley C, Leibo S, Goodrowe K. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod Fertil* 51: 99–108.
83. Henry MA, Noiles EE, Gao DY, Mazur P, Critser JK. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril* 60:911-918.

84. Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22.
85. Iaffaldano N, Di Iorio M, Pina M. 2012. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Therio* 78(6):1381-9.
86. Kershaw-Young C, Maxwell W. 2011. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Therio* 76:1197-1206.
87. Kershaw-Young C, Maxwell W. 2012. Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species. *Reprod Domest Anim* 47(4): 369-375.
88. Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Therio* 54:1477-1498.
89. Long JA, Kulkarni G. 2004. An effective method for improving the fertility of glycerol- exposed poultry semen. *Poult Sci* 83:1594-1601.
90. Mancisidor SI. 2013. Efecto del α -tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Biólogo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 75p.
91. Manosalva I. 2003. Capacitación in vitro de espermatozoides de alpaca. Tesis de Biólogo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 72p.
92. Mantovani R, Rofo A, Falomo M, Bailoni L, Vicenti L. 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa. *Reprod Nutr Dev* 42:217-226.
93. Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraiz P, de Paz P, Anel L. 2006. Comparacion of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Therio* 65:471- 485.
94. Massip A, Leibo S, Blesbois E. 2004. Criobiology and the breeding of domestic animals. In life in the frozen state. Benson E, Fuller B, Lane N (eds). Londres: Francis Group. p 371-393
95. Maxwell WMC, Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42:55-65.
96. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 71:345-355
97. Mazur P. 1984. Freezing and living cells: mechanism and implications. *Am J Physiol* 247:125-142.

98. McClean R, Zee YP, Holt WW, Johnston SD. 2008. Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology* 57:304-347.
99. Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodriguez J. 2002. Current status of cryopreservation: why isn't it better?. *Therio* 57:327-344.
100. Moce E, Grasseau I, Blesbois E. 2010. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Anim Reprod Sci* 122:359-366.
101. Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. 1994. Incorporating of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Therio* 42:849-858.
102. Mortimer D. 1985. The male factor in infertility. II. Sperm function testing. *Curr Prob Obstet Gynecol* 8:1-75.
103. Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca sperm: a comparison of citrate- Tris- and lactose- based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev* 19:792-796.
104. Morton M, Vaughan J, Maxwell W. 2008. The continued development of artificial insemination technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT, Australia. 205p.
105. Morton K, Evans G, Maxwell W. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen- thawed epididymal alpaca sperm. *Therio* 74:311-316.
106. Mosca F, Madeddu M, Abdel A, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* 73(3):343-347.
107. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen- thawed bull semen. *Therio* 57:1695-1706.
108. Neely D, Bravo W. 1998. Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. In: Youngquist RS, ed. *Current therapy in large animal therio*. USA: WB Saunders, p 787-792.
109. Ordóñez C, Cucho H, Ampuero E, Antezana W, Cayo S. 2013. Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova* 3:65-66.

110. Pacheco JI, Perez GM, Calle L, García W. 2009. Efecto del lugar y la hora de inseminación artificial sobre la fertilidad en Alpacas (Effect of the place and the hour of artificial insemination on the fertility in Alpacas). [Internet], [06 junio 2018]. Disponible en:
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080809/080905.pdf>
111. Paricahua E. 2001. Evaluación del semen sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca (*Llama pacos*). Tesis de médico veterinario y zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano.
112. Pérez L, Valcárcel A, De-las-Heras M, Moses D, Baldassarre H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Therio* 46:131-140.
113. Pérez MG, Zevallos JP, Pérez UH. 2016. Viabilidad in vitro e in vivo de los espermatozoides congelados/descongelados del conducto deferente de Alpacas (*Vicugna pacos*). [Internet], [06 junio 2018]. Disponible en:
<http://huajsapata.unap.edu.pe/ria/index.php/ria/article/view/203/0>
114. Piomboni P, Focarelli r, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. 2011. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl* 35: 109-24.
115. Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
116. Portal Agrario. 2017. Lima: Ministerio de Agricultura. [Internet], [24 abril 2018]. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/objetivos/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/298-camelidos-sudamericanos?start=2>
117. Quintano J. 2001. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente utilizando tres dilutores. Tesis de médico veterinario y zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano
118. Quintano J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 45p.
119. Rakha B, Ansari M, Akhter S, Zafar Z, Naseer A, Hussain I, Santiago-Moreno J, Blesbois E. 2017. Dimethyleacetamide improves the cryosurvivability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Therio* 78:27-33.

120. Ramahlo-santos J, Schatten G, Moreno R. 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosoma reaction. *Biol of Reprod* 67: 1043-1051.
121. Raskin R, Meyer D. 2010. *Citología canina y felina*. 2a ed. Barcelona: Multimédica. p 460-467
122. Rasul Z, Ahmed N, Anzar M. 2007. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glicerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Therio* 68: 813-819.
123. Parrish J, Susko-Parrish J, Uguz C, First N. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod* 51:1099-1108.
124. Ratto M, Wolter M, Gómez C, Berland M. 1999. Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco.
125. Restrepo G, Rodríguez L, Duque J. 2016. Proliferación microbiana y calidad posdescongelación de semen equino criopreservado en presencia de antibióticos. *Rev Inv Vet Perú* 27:316-325
126. Reyes-Moreno C, Boilard M, Sullivan R, Sirard M. 2002. Characterization and identification of epididimal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol Reprod* 66:159-166.
127. Risopatrón J, Peña P, Miska W, Sánchez R. 2001. Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. *Androl* 33:63-67.
128. Rodríguez C. 2009. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 72 p.
129. Rodríguez-Martínez H, Ekstedt E, Einarsson S. 1990. Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 13(3): 238-43.
130. Roldan E. 1996. Mecanismos que preparan a los espermatozoides para la fecundación. *Memorias del XIX Curso Internacional de Reproducción Animal*. Madrid, España
131. Rota A, Milani CH, Cabianca G, Martini M. 2006. Comparison between glycerol and ethileneglycol for dog semen cryopreservation. *Therio* 65(9):1848-1858.

132. Roushdy K, El-Sherbieny M, El-Gany F, El-Sayed M. 2014. Semen cryopreservation for two local chicken Strains as a tool for conservation of Egyptian Local genetic resources. J Egyptian Poult Sci 34:607-618.
133. Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapeña A, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, López-Pérez M. 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. Clin Chem 44:1616-20.
134. Ruiz-Pesini E, Lapeña A, Diez C, Alvarez E, Enríquez J, López-Pérez M. 2000. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. Clin Chim Acta 300(1-2): 97-105.
135. Salamon S, Maxwell W. 1995. Frozen storage of ram semen II: Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. Anim Reprod Sci 38:1–36.
136. Salamon S, Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci 62:77-111.
137. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian J Androl 7:303-309.
138. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista-Vargas S. 2016. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. Anim Reprod Sci 173:49-55.
139. Santiani A, Evangelista-Vargas S, Vargas S, Gallo s, Ruiz L, Orozco V, Rosemberg M. 2016. Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. J Androl vol 49.
140. Seifi-Jamadi A, Ahmad E, Ansari M, Kohram H. 2017. Effect of addition of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezability of Mahabadi goat semen. Cryobiology 75:15-20.
141. Sexton T. 1975. Relationship of the method of addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa. Poultry science 54: 845–8.
142. Silva P, Gadella B. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. Therio 65:958-978.
143. Sumar J, Garcia M. 1986. Fisiología de la reproducción de la alpaca. En: Técnicas nucleares y afines en producción y sanidad animal. Viena. 149-177.

144. Sumar J. 1991. Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
145. Sumar J. 2002. Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. Mexico: Mc Graw Hill Interamericana p 224-242.
146. Terreros M. 2011. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 76 p.
147. Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. 2015. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Rev Inv Vet Perú 26: 420-426.
148. Tibary A, Memon M. 1999. Reproduction in the male South American Camelidae. J Camel Prac Res 6:235-248.
149. Tibary A, Vaughan J. 2006. Reproductive physiology and infertility in male south American camelids: A review and clinical observations. Small Ruminant Res 61:283- 298.
150. Tiersch T, Figiel C, Wayman W. 2004. Cryopreservation of Sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow North American. J Aquaculture 66: 8 – 14.
151. Tulsiani D, Abou-Haila A, Loeser C, Pereira, B. 1998. Review: The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. Exp Cell Res 240: 151-164.
152. Tulsiani D. 2006. Glycan- modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potencial role in sperm maturation. Mol Cell Endocrinol 250:58-65.
153. Turner T, 1979. On the epididymis and its function. Invest Urol 16: 311–321.
154. Ugarelli A, Evangelista S, Choez K, Pacheco J, Santiani A. 2015. Evaluation of different concentrations of FITC-PSA and FITC-PNA for the study of acrosomal integrity in alpaca spermatozoa. Spermoa 5:87-92
155. Uriondo H, Alvarez C, Rodríguez C, Uipan P, Valdivia M. 2008. Evaluación de la motilidad y reacción acrosómica durante la capacitación *in vitro* de espermatozoides de alpaca en presencia de zona pelúcida intacta y solubilizada. En XIX Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo.

Chile.

156. Valdivia M, Ruiz M, Bermudez L, Quinteros S, Gonzáles A. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso sobre camélidos. Cusco, Perú.
157. Valdivia M, Canorio N, Carrillo E, Uipan P. 2005. Effects of cryoprotectants on Alpaca's spermatozoa during cooling process. 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Biology of Reproduction, special issue. 24-27. 228.
158. Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston, ACT, Australia.
159. Visconti P, Floman H. 2010. Mechanisms of sperm- egg interactions: between sugars and broken bonds. *Sci Signal* 3:35.
160. Von-Baer L, Hellemann C. 1998. Semen characteristics in the llama (*Lama glama*). *Archiv Med Vet* 30:171-176.
161. Vuthiphandchai V, Chomphuthawach S, Nimrat S. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Therio* 72:129-38.
162. Walters E, Benson J, Woods E, Critser J. 2009. The history of sperm cryopreservation. In: Pacey A, Tomlinson M, ed. *Sperm banking*. Londres: Cambridge University Press, 136 p.
163. Watson P. 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 1:283-350.
164. Watson P. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris G, Clarke A, ed. *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Londres Academic Press, p 189–218.
165. Watson P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. *Reprod Fert Dev* 7:871-891.
166. Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60: 481–92.
167. Way A, Griel L, Killiam G. 2000. Effects of accessory sex gland fluid on

viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. J Androl 21: 213-219.

168. Yang H, Norris M, Winn R, Tiersch T. 2010. Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. Cryobiology 61:211-9.